

Universidad de Salamanca
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía
Laboratorio de Neuroendocrinología del INCyL e IBSal



Posible interacción de la Aromatasa P450 y la hipófisis reproductora.

Francisco López Sánchez

Salamanca
2014

José CARRETERO GONZÁLEZ, Catedrático de Embriología y Anatomía Humana; Ángel SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, Catedrático de Medicina Interna, y María José SÁNCHEZ LEDESMA, Profesora Contratada Doctora de Neurocirugía, como directores del presente trabajo de Tesis Doctoral,

HACEN CONSTAR:

Que D. Francisco LÓPEZ SÁNCHEZ ha realizado el trabajo "Posible interacción de la aromatasa P450 y la hipófisis reproductora" en el laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, con financiación pública competitiva del Instituto de Salud Carlos III.

Que a nuestro juicio, el trabajo reúne los requisitos de originalidad, dedicación y labor investigadora; así como de formación investigadora de su autor que pueden ser exigibles a un trabajo de Tesis Doctoral.

Igualmente reúne todos los requisitos legales en la manipulación de animales, así como en el consentimiento informado a pacientes para la manipulación de muestras humanas.

Por todo ello, damos el visto bueno para la presentación del trabajo para su defensa y lectura.

En Salamanca a 8 de Julio de 2014.

José Carretero

Ángel Sánchez

María José Sánchez

Índice

Prólogo.....	7
Agradecimientos.....	11
Introducción	15
La Hipófisis.....	19
Histología de la Adenohipófisis	22
Tipos celulares y clasificaciones	22
Células somatotropas	23
Células de prolactina	24
Células opio-córtico-melanotropas	26
Células gonadotropas.....	27
Células tirotropas.....	28
Células folículo-estrelladas.....	29
Células productoras de péptidos.....	30
Hormonas adenohipofisarias.....	33
TSH, tirotropina u hormona estimulante del tiroides.....	33
ACTH o adrenocorticotropina.....	34
GH u hormona del crecimiento	36
PRL o prolactina	38
Gonadotropinas.....	40
Función biológica de la FSH y la LH en el varón.....	42
Función biológica de la FSH y la LH en el varón.....	42
La aromatasa.....	45
Los receptores de estrógenos	47
Hipótesis y Objetivos del Estudio	49
Antecedentes.....	51
Objetivos.....	53
Objetivo general	53
Objetivos específicos	53
Material y Métodos	54
Animales empleados para el estudio experimental.....	56
Genotipaje	56
Extracción, aislamiento y purificación del DNA.....	56
Amplificación del DNA purificado, PCR.....	57
Sacrificio de los animales, Extracción y Procesado de las muestras	58
Inmunocitoquímica.....	59
Detección inmunocitoquímica de LH	59
Controles de las reacciones inmunocitoquímicas.....	59
Estudio de las muestras.....	60
Morfometría y Densitometría	60
Análisis morfométrico de los cortes histológicos.....	60
Análisis planimétrico, cuantificación celular	61
Análisis Estadístico de los resultados.....	61
Determinación de LH en mujeres.....	61
Modelo de Consentimiento informado para las pacientes incluidas en el estudio....	61
Aprobación del comité ético para la realización del estudio.....	63
Resultados	65

Prevalencia de Adenomas y Prolactinomas hipofisarios.....	67
Hipófisis no tumoral	69
Células Gonadotropas positivas a LH en ratones hembras.....	69
Distribución general.	69
Células gonadotropas positivas a LH en las hembras de 22 meses de edad.	70
Región Dorsal Tuberal (1).	72
Región dorsal (6).....	80
Región lateral (5).	88
Región Polar (4).	96
Región Ventral Lateral (3).....	104
Región Ventral Medial (2).....	112
Región Medial próxima a la Pars Intermedia (9).	120
Región Central Medial (8m).....	128
Región Central Lateral (8l).	136
Región dorsal infracavitaria (7).	144
Células Gonadotropas positivas a LH en ratones machos.....	152
Distribución general.	152
Células gonadotropas positivas a LH en los machos de 22 meses de edad.....	153
Región Dorsal Tuberal(1).	155
Región dorsal (6).....	163
Región lateral (5).	171
Región Polar (4)	179
Región Ventral Lateral (3).....	187
Región Ventral Medial (2).....	195
Región Medial próxima a la Pars Intermedia (9).	203
Región Central Medial. (8m).....	211
Región Central Lateral (8l).	219
Región dorsal infracavitaria (7).	227
Discusión.....	¡Error! Marcador no definido.
Comentarios sobre la Metodología empleada.....	¡Error! Marcador no definido.
Inmunocitoquímica.....	¡Error! Marcador no definido.
Morfometría y Planimetría.....	¡Error! Marcador no definido.
Los ratones knock out para la aromatasa (ArKO).....	¡Error! Marcador no definido.
Comentarios sobre los resultados obtenidos.....	¡Error! Marcador no definido.
Ausencia de la aromatasa P450 y génesis de adenomas hipofisarios.....	¡Error! Marcador no definido.
Localización regional dentro de la hipófisis de las células psitivas a LH.	¡Error! Marcador no definido.
Variaciones morfológicas de las células positivas a LH. .	¡Error! Marcador no definido.
Inhibidores de la aromatasa en la práctica clínica. Efecto sobre la secreción de LH.	¡Error! Marcador no definido.
Conclusiones.....	¡Error! Marcador no definido.
Referencias Bibliográficas.....	¡Error! Marcador no definido.

Prólogo

La historia del descubrimiento del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y su papel en la regulación de los sistemas nervioso, endocrino y reproductor comienza con la descripción de ciertas sustancias sutiles que se denominaron “espíritus animales”.

Con la adopción del método científico, algunos investigadores pioneros postularon que la hipófisis era la verdadera glándula directora del ciclo genital, basándose en el hecho de que la hipofisectomía producía atrofia genital en animales de experimentación.

Los trabajos que permitieron relacionar las estructuras cerebrales con el ciclo reproductor femenino datan del siglo pasado. En 1937 Harris comprobó el origen neurológico de los mecanismos de control de la ovulación demostrando que la estimulación eléctrica del hipotálamo en la coneja inducía ovulación. Una década más tarde, el grupo de Knobil descubrió de forma casual que la secreción de la hormona luteinizante (LH) en la mona Rhesus ovariectomizada era pulsátil, que es a su vez la forma común de secreción para todas las especies, incluida la humana.

Con estos estudios se empezaba a conocer con más profundidad el control neuroendocrino del ciclo reproductor. Por otra parte, desde la descripción de la teoría de las dos células-dos gonadotropinas, se supo que ambas gonadotropinas hipofisarias, la hormona foliculoestimulante (FSH) y la LH, funcionaban como un equipo perfectamente sincronizado con un único objetivo: el desarrollo folicular y la maduración del ovocito. Esta teoría establecía que cada una de ellas poseía una función específica que era ejercida durante todo el ciclo menstrual. No obstante, hoy sabemos que las funciones de ambas hormonas se encuentran interrelacionadas y, a su vez, moduladas por numerosos factores autocrinos y paracrinos.

El conocimiento del verdadero papel biológico que ejercen los estrógenos también se ha ido dilucidando en las últimas décadas, especialmente en lo que se refiere a la regulación de la biosíntesis extragonadal.

Los ovarios son la principal fuente de estrógenos en las mujeres pero también se sintetizan en otros tejidos (adiposo, hueso, cerebro...). La importancia de esta producción extragonadal radica en que se convierten en la principal fuente de estrógenos durante la menopausia. La cantidad total de estrógenos extraováricos es pequeña y solamente actúan a nivel local por medio de mecanismos paracrinos y autocrinos. Sin embargo, alcanzan concentraciones tisulares elevadas, por lo que desempeñan una importante acción biológica.

Los varones necesitan estrógenos para mantener la fertilidad. No obstante, las líneas de investigación actuales han ido descubriendo nuevas e inesperadas funciones de los estrógenos dentro de la fisiología masculina. Parece cada vez más claro que son esenciales para la práctica totalidad de los sistemas, hasta el punto de que podrían convertirse en una herramienta terapéutica futura para múltiples patologías

La enzima clave en la biosíntesis de estrógenos es la aromatasa P450, que transforma los andrógenos aromatizables (como la testosterona) en estrógenos. Puesto que la secreción hipofisaria se ve afectada por la actuación de los esteroides gonadales, la posibilidad de que la glándula produzca aromatasa y que ésta desarrolle su actuación a nivel local podría ser especialmente relevante, especialmente en aquellos aspectos relacionados con la reproducción.

Para profundizar en el papel que podría tener la aromatasa en la modulación de la función hipofisaria, en el presente trabajo se ha empleado el modelo experimental proporcionado por los ratones *knock out* para aromatasa (ArKO). Estos animales se obtienen mediante una disrupción selectiva del gen CYP19, que codifica dicho enzima. El desarrollo de este modelo de insuficiencia de estrógenos es ideal para investigar el papel de estas hormonas. Asimismo, desde el punto de vista clínico, hemos considerado que también podría resultar interesante constatar que los resultados de nuestro estudio muestran cierto paralelismo con lo observado en mujeres con cáncer de mama tratadas con antagonistas de aromatasa.

Esta Tesis es el fruto de la ilusión personal por culminar un trabajo de investigación novedoso en el campo de la Endocrinología Ginecológica y la Reproducción. Las sendas de la investigación son siempre sinuosas, y en el caso concreto de los eventos neuroendocrinos, parecen serlo aún más. Son tantos los factores que pueden participar, que no es posible tener una idea del todo precisa de dichos eventos, y hay que tratar de estudiarlos de forma razonable con la ayuda de unas pocas variables. No obstante, con el presente trabajo, esperamos haber contribuido a un mejor conocimiento del tema y, por ende, a una potencial aplicación de este conocimiento a la práctica clínica habitual.

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Profesor Carretero, director de esta investigación, por la orientación, seguimiento y supervisión de la misma. Su motivación constante y el apoyo recibido a lo largo de estos años han sido fundamentales para que esta obra haya llegado felizmente a término. Siempre será para mí un ejemplo de sabiduría, constancia y vocación docente.

Al Departamento de Anatomía e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, por abrirme las puertas de su laboratorio y poner a mi disposición todas las instalaciones y recursos necesarios para realizar este trabajo.

Al Profesor Sánchez Rodríguez, mi gran amigo Ángel, porque su ayuda ha sido fundamental para que esta Tesis sea una realidad. Ha estado siempre a mi lado, en los buenos y malos momentos, apoyándome y animándome a continuar. Le doy las gracias por todos sus esfuerzos y por haberme hecho creer que podía hacerlo. Por todo eso y mucho más este trabajo también le pertenece.

A mi querido y siempre añorado Antonio López Salvá, maestro, mentor y amigo. Porque con su sabiduría y su ejemplo me mostró el camino hacia la excelencia profesional y personal. Nunca te olvidaré. Y a Maria Antonia Salvá y Castellví, su madre, por demostrarnos a todos que su corazón está enfermo porque ya no puede ser más grande.

A Manuel Albi González, mi entrañable Manolo, por su amistad y por los inolvidables momentos que hemos compartido. Nunca un Jefe fue tan buen compañero, ni un compañero fue tan buen Jefe.

A mis padres, por todos los valores que me han inculcado, y porque siempre me han hecho sentir que su amor era incondicional.

A Laura, mi mujer, por su cariño, su infinita paciencia y su comprensión. Con su ejemplo he aprendido la lección de que con optimismo y grandeza de corazón es posible alcanzar cualquier meta.

A la alegría de mi vida, mis hijos Pablo, Elena y Ángela, por los ratos que no he podido dedicarles durante la elaboración de este trabajo.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y han hecho posible que hoy vea la luz.

A todos, gracias de corazón.

El trabajo de Tesis Doctoral que se presenta ha sido realizado en el Dpto. de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina, en el laboratorio de Neuroendocrinología del INCyL y del IBSal, financiado con cargo a los siguientes proyectos de investigación:

SAF2002-00808, Ministerio de Ciencia y Tecnología.

FIS PI030818, Instituto de Salud Pública Carlos III.

Los ratones heterocigotos necesarios para formar la colonia de ratones knock out, fueron gentilmente cedidos por el Dr. Harada.

Introducción

Un elemento vital en el mantenimiento de los organismo vivos es la reproducción.

La reproducción y su regulación se complica filogénicamente a lo largo de la evolución, adquiriendo diferencias notables de unas especies a otras. Así su regulación es diferente incluso en los mamíferos, lo que dificulta de forma notable su estudio y poder alcanzar conclusiones válidas para la especie humana desde la experimentación animal.

En especies superiores en el mecanismo regulador de la reproducción es lo suficientemente complejo como para que las mismas sustancias reguladoras desarrollen efectos opuestos actuando en los mismos lugares dentro del organismo. Indudablemente esto acontece por los niveles o concentraciones de las sustancias en puntos determinados o por la expresión de diferentes receptores sobre los que las mismas actúan.

Aunque influido por agentes externos o circunstancias particulares de dieta, estrés o enfermedades, el sistema endocrino es el encargado de la regulación de la reproducción.

Todo el sistema endocrino está implicado en mayor o menor grado en la reproducción, pero es el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal el que sin duda marca la dinámica reproductora.

Dentro del eje en nuestro trabajo hemos fijado nuestra atención en la hipófisis, elemento central del eje regulador y glándula productora de las hormonas gonadotropas folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH).

En este capítulo de introducción fijaremos nuestra atención en la hipófisis y sus células y en las funciones biológicas de las hormonas gonadotropas FSH y LH; dejando para el capítulo de discusión de nuestro estudio los aspectos más relevantes del funcionamiento y regulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

La Hipófisis.

La hipófisis ha sido descrita como responsable de las más diversas funciones a lo largo de la historia, entre ellas la de ser el lugar donde reside el alma humana. Pero no fue hasta principios del siglo XX cuando se estableció su función endocrina, y el papel del hipotálamo en el control de sus funciones (Cushing, 1912).

En la especie humana (figura In1), la hipófisis es una glándula ovalada, simétrica que pesa alrededor de 0'6gr, y cuyas dimensiones aproximadas son 13x8x9mm.

Se encuentra rodeada de duramadre y se asienta en la silla turca, una concavidad ósea de la cara superior del hueso esfenoides, que la protege en sus partes anterior, inferior y posterior.

Por la parte superior, se encuentra protegida de la presión del líquido cefalorraquídeo por el diafragma selar, que es una extensión de la duramadre, en cuyo centro presenta un orificio a través del cual pasa el tallo hipofisario, que comunica la hipófisis con el hipotálamo.

En cuanto a la relación con estructuras vecinas, en la parte anterior se encuentra el quiasma óptico, y en las caras laterales está el seno cavernoso, a través del cual pasan los pares craneales III, IV, primera rama del V (existiendo la variación anatómica del paso de la segunda rama), el VI y la arteria carótida interna.

La hipófisis se divide en dos partes bien diferenciadas: el lóbulo neural y la adenohipófisis. El lóbulo neural es sistema nervioso central y constituye la porción más ventral del hipotálamo y, dentro de él, de la neurohipófisis. La adenohipófisis es glandular y deriva de la porción ventral de la vesícula hipofisaria formada por el hundimiento intraembrionario de la bolsa de Rathke neuroectodérmica del estomodeo primitivo.

En la adenohipófisis se diferencian, a su vez, dos partes: la pars distalis y la pars tuberalis.

En otras especies animales, como los roedores, también se distingue la pars intermedia, considerado como una estructura independiente derivada de la porción dorsal de la vesícula hipofisaria. Quedando un espacio entre la pars distalis y la pars intermedia que se conoce como caverna hipofisaria, esta caverna en la especie humana es rudimentaria o no existe, no pudiéndose diferenciar morfológicamente la pars intermedia del resto de la adenohipófisis.

La adeno y la neurohipófisis tienen orígenes embriológicos distintos. Del neuroectodermo diencefálico se origina la neurohipófisis, mientras que la adenohipófisis y el lóbulo

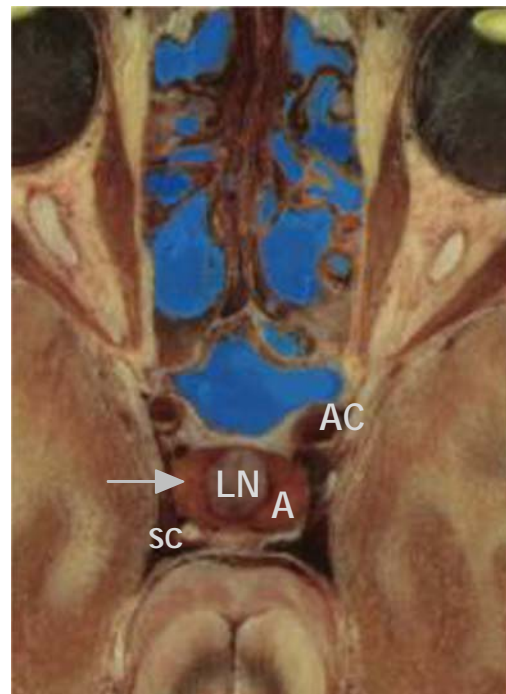


Figura In1. Imagen tomada de Human Visible de un corte axial de la cabeza en la que se aprecia la hipófisis (flecha) alojada en la silla turca. En ella se diferencia el lóbulo neural (LN) y la adenohipófisis (A). A ambos lados se observa bien el seno cavernoso (sc) y la arteria carótida interna (AC).

intermedio tienen su origen en el estomodeo o ectodermo oral. En la especie humana, hacia el día 21 de gestación, se origina la llamada bolsa de Rathke. En la rata la bolsa se forma entre los días 10 y 11 de gestación.

Esta estructura se forma a partir de una evaginación de la hoja ectodérmica en dirección craneal, y que va a mantener un contacto íntimo con una prolongación en sentido caudal del neuroectodermo diencefálico (Charles y col., 2005).

Hacia la quinta semana de desarrollo embrionario, la bolsa de Rathke se va a cerrar sobre sí misma y ya en torno a la sexta semana pierde su conexión con el ectodermo oral mediante apoptosis de las células del epitelio intermedio por inducción de los factores de transcripción *pitx1* y *pitx2* (Sornson y col., 1996).

En el proceso mediante el cual la bolsa se cierra sobre sí misma, deja en su interior una pequeña hendidura que diferencia una parte dorsal y otra ventral, formando la vesícula hipofisaria. De la parte ventral, por multiplicación y diferenciación celular, se formará la pars distalis. La pars intermedia, es un resto adelgazado de la pared dorsal de la bolsa, que cuando existe sufre un proceso de proliferación y diferenciación menos complejo que la pars distalis, dando lugar a un tipo celular único y adquiriendo un tamaño mucho menor que la pars distalis.

El lóbulo neural de la hipófisis es la porción terminal del infundíbulo diencefálico, del que deriva, quedando unido a él a través del tallo infundibular.

Cuando se encuentran la porción nerviosa y la glandular de la hipófisis, las paredes laterales de la vesícula rodean, por delante y a los lados, al tallo infundibular formando así la pars tuberalis, a modo de un collar o vaina alrededor del mismo. El conjunto de tallo infundibular y pars tuberalis se conoce como tallo hipofisario.

Dirigiendo nuestra atención hacia la parte distal y tuberal de la hipófisis, por ser el motivo de estudio en nuestro trabajo, es importante saber que el proceso de diferenciación celular que acontece es muy complejo y en su regulación intervienen factores de transcripción, hormonas y factores de crecimiento.

En cuanto a la vascularización, es importante destacar el papel fundamental que juega en la regulación hipotalámica de la función hipofisaria (Clarke y col., 1993). El aporte sanguíneo llega a la adenohipófisis a través del denominado sistema portal hipofisario, compuesto por las arterias hipofisarias superiores, ramas de la carótida interna, que van a finalizar en una extensa red capilar que penetra y rodea la eminencia media. Esta red de capilar presenta una gran permeabilidad, gracias a los capilares fenestrados (Shaver y col., 1992). La vascularización de la neurohipófisis corre a cargo de las arterias hipofisarias inferiores.

La regulación de la función hipofisaria es llevada a cabo por el hipotálamo. Distintos estímulos van a actuar sobre el córtex cerebral, que enviará dichos estímulos al hipotálamo, y éste a su vez enviará señales de estimulación o de inhibición sobre la hipófisis. La hipófisis se encarga de controlar la secreción hormonal en las glándulas periféricas. El feedback se establece mediante señales desde las glándulas periféricas a todos los niveles, pero sobre todo a nivel hipotálamo-hipofisario. Por último hay una serie de factores que actúan localmente sobre la hipófisis y el hipotálamo, como citoquinas, factores de crecimiento, neuropéptidos y neurotransmisores.

La zona de conexión entre el hipotálamo y la hipófisis es la eminencia media, y el sistema portal de flujo sanguíneo que la rodea. La eminencia media se compone de tres zonas, la zona endimaria, la zona interna y la externa. La zona interna de la eminencia media se compone de axones que van desde el núcleo supraóptico y paraventricular hasta la hipófisis posterior, y de axones que vienen desde las neuronas hipofisotropas y van hasta la zona externa de la eminencia media. La zona externa por tanto, se compone de los axones de las neuronas hipofisotropas y de los que provienen de los núcleos periventricular, paraventricular y arcuato.

Histología de la Adenohipófisis.

La adenohipófisis es la parte de la hipófisis que se comporta como una glándula endocrina. Está formada por un conjunto de células con diferentes fenotipos que sufren procesos de diferenciación diferentes lo que les da funciones secretoras distintas. El porcentaje de células que liberan una u otra hormona es diferente entre ellas, y entre especies; además hay controversias de unos autores a otros.

Presentamos a continuación alguna de las aproximaciones porcentuales descritas en la bibliografía. El 50% de las células son somatotropas, y secretan GH u hormona del crecimiento. Estas células se sitúan fundamentalmente en las alas laterales del lóbulo anterior (Asa, 1998). El 15% de las células son lactotropas, secretan prolactina (PRL), y se encuentran en las zonas posteriomediales y posterolaterales. Otro 15% lo constituyen las células corticotropas, que secretan proopiomelanocortina (POMC), que es un precursor de la ACTH (hormona adrenocorticotropa), MSH (melatonina), LPH (lipotrópicas) y endorfinas, que van a ocupar la zona central de la adenohipófisis. El 10% de las células van a ser gonadotropas, que secretan la hormona luteinizante (LH) y la foliculoestimulante (FSH), que ocupan la pars distalis y la pars tuberalis (Morgan y col., 1996). Por último el 5% restante son células tiotropas, que secretan TSH (tirotropina u hormona estimulante del tiroides) y que ocupa la parte más anterior.

Además, en la adenohipófisis encontramos células no endocrinas, como las células foliculares, foliculoestrelladas granulares, las llamadas “null cells” o inespecíficas y los oncocitos, muy ricos en mitocondrias.

En la neurohipófisis encontramos prolongaciones axonales que se encargan del control de la secreción de la vasopresina (AVP) y de la oxitocina (OT) además de células de soporte, y pituicitos, que se intervienen en la regulación de la secreción de AVP.

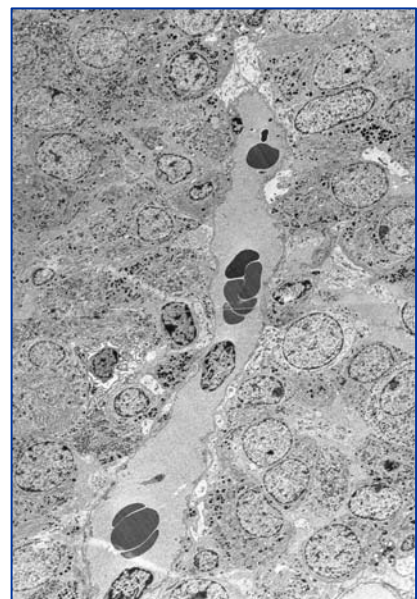
La adenohipófisis está constituida por un gran número de elementos celulares, predominantemente de estirpe epitelial, que se caracterizan por tener, la mayoría de ellos, capacidad para la producción de hormonas. Se suelen disponer a modo de cordones, masas irregulares o folículos, todo ello rodeado de un entramado de tejido reticular en el que se sitúan los sinusoides vasculares. (Para revisión ver: Girod, 1984; Asa y col., 1995).

Tipos celulares y clasificaciones.

Para el estudio de la estructura citológica de la adenohipófisis se han utilizado diversas técnicas a lo largo de la historia, en un intento de diferenciar distintos tipos celulares. La técnica más clásica

consiste en la tinción simple con hematoxilina y eosina, que nos permite distinguir tres tipos celulares: *células acidófilas*, entre las que se encontrarían las células productoras de Prolactina, ACTH y GH; las *células basófilas* serían las células productoras de TSH, FSH y LH Y células cromóforas que no van a tomar el colorante.

Después se usaron técnicas histoquímicas, como el PAS,



lo que permitió su clasificación en *células PAS positivas*, con gránulos de secreción glicoproteicos (que se corresponden con las células basófilas) y *células PAS negativas*, con gránulos de secreción polipeptídicos o puramente proteicos (que se corresponden con las células acidófilas).

Más tarde se clasificaron en cuanto a sus características ultraestructurales (Schultz y col., 1979), lo que permitió describir 2 tipos celulares: *Células productoras de hormonas*, situadas fundamentalmente en el interior del parénquima y que contenían distintos tipos de gránulos de secreción y *células de sostén*, que son células agranulares, estrelladas o pericavitarias, situadas fundamentalmente en la zona marginal.

Por último, usando técnicas de inmunohistoquímica se pudo clasificar las *células en función de su secreción hormonal* (Nakane, 1970). Esta clasificación, que es la utilizada en la actualidad, permite clasificar las células adenohipofisarias en *somatotropas*, *mamotropas* (lactotropas, o células de Prolactina), *gonadotropas*, *tiro tropas* y *corticotropas* (también llamadas opio-melano-corticotropas).

A continuación, describiremos algunas características que definen a estos tipos celulares.

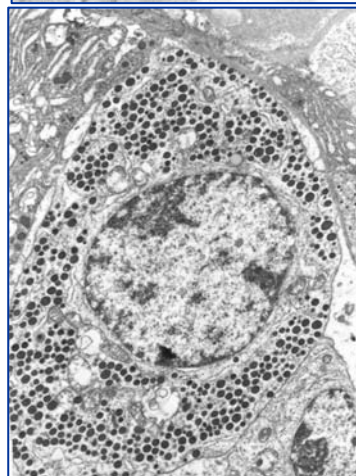
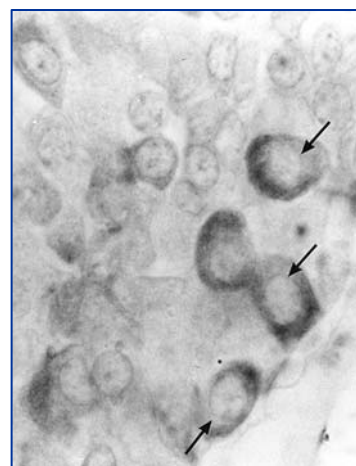
Células somatotropas.

Las células somatotropas son las células más abundantes de la adenohipófisis, constituyendo entre el 20 y el 65% del total. Se localizan sobre todo en las alas laterales del lóbulo anterior de la adenohipófisis, distribuidas de manera homogénea. Este tipo celular fue caracterizado por primera vez por Benda en 1900 cuando estableció una correlación entre la acromegalia y el adenoma eosinófilo.

Vistas por microscopía óptica son células de tamaño medio, esféricas u ovales y con un núcleo también esférico, generalmente de localización excéntrica. Si se emplean técnicas de inmunohistoquímica se puede observar una reacción intensa y homogénea a GH en todo el citoplasma. Pueden observarse células más pequeñas con la reacción a GH distribuida de forma globular en las zonas próximas al complejo de Golgi.

Utilizando microscopía electrónica se ven como células esféricas con un núcleo también esférico y un nucleolo bien desarrollado (Horvath y Kovacs, 1988). El retículo endoplásmico rugoso se localiza agrupado en la zona central del citoplasma (Amat y Boya, 1970; Girod, 1984).

El aparato de Golgi es discretamente prominente, y generalmente se localiza en las proximidades del núcleo, presentando cisternas, a veces dilatadas, que pueden contener gránulos pequeños en proceso de formación. Suele haber mitocondrias con matriz clara y 1 ó 2 lisosomas que contienen un material



heterogéneo. Los centriolos se localizan cerca de la superficie de la célula o cerca del complejo de Golgi. También se pueden ver microtúbulos, algunos en conexión con el aparato de Golgi o con los centriolos.

Los gránulos de secreción suelen medir entre 350 y 500 nm, pero pueden llegar hasta los 800 nm. Tienen tendencia a acumularse en la periferia de la célula. Aparte de contener GH, algunas células pueden contener la subunidad alfa de las hormonas glicoproteicas.

Costoff (1973) describió 2 tipos de células somatotropas. El tipo 1 o activo tiene un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado, con un aparato de Golgi hipertrofiado y pocos gránulos de secreción situados en la periferia. Estas células suelen encontrarse en parte central de la glándula. El tipo 2 o de almacenamiento tiene poco desarrollados el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi y tienen una gran cantidad de gránulos. Son las más frecuentes y se encuentran sobre todo en la periferia de la pars distalis.

Células de prolactina.

También llamadas células lactotropas o mamotropas, estas células fueron identificadas por microscopía electrónica por Hedinger y Farquhar (1957). Su proporción dentro de la Hipófisis varía dependiendo del sexo, predominando en las hembras (Costoff, 1973; Aumuller y col., 1978; Wilson y Christensen, 1980, Sasaki y Sano, 1980 y 1982). Este porcentaje depende también del estado reproductivo de la hembra (no gestante, gestante o en lactancia).

También puede variar con determinados tratamientos, como los estrógenos. Los datos varían según los autores y la técnica empleada. Usando microscopía electrónica, el porcentaje de células de Prolactina en los machos oscila entre el 2.2% y el 15%, mientras que en las hembras está entre el 15% y el 40% (Costoff, 1973; Surks y Defesi, 1977; Takahashi y Kawashima, 1982; Asa y col., 1982).

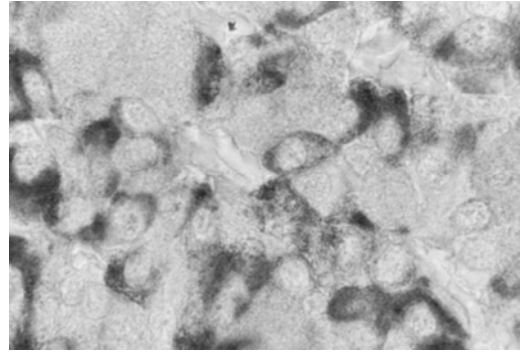
Usando técnicas de inmunohistoquímica estos porcentajes varían. Así Dada y col (1984) cifran en el 50% para el macho y el 52% para la hembra los porcentajes de células mamotropas en la rata, con densidades de volumen del 20.5 para el macho y del 28.09 para la hembra. En nuestro laboratorio hemos valorado la densidad numérica de las células Prolactina en el 4.26 células / 1000 μm^2 para el macho y 6.40 células / 1000 μm^2 para la hembra (Carretero y col., 1988).

Estas células se distribuyen por toda la pars distalis, pero son más abundantes en las partes posteromediales, posterolaterales y cerca de la pars intermedia. En la rata, aparecen fundamentalmente en la porción central de la Hipófisis, asociadas a las corticotropas (Costoff, 1973).

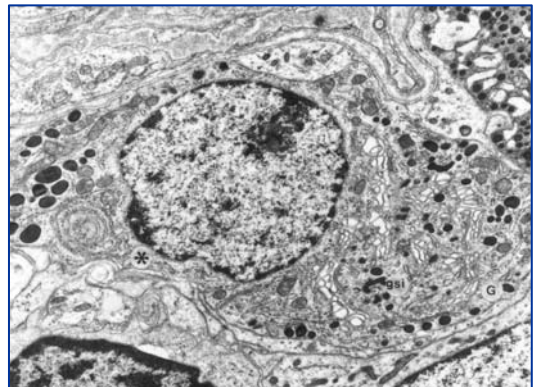
Otros autores, como Nakane (1970), las había localizado en la porción anteroventral de la glándula y en áreas cercanas al lóbulo intermedio, rodeando con frecuencia a células gonadotropas. Suelen encontrarse distribuidas por todo el lóbulo distal (Gracia-Navarro y Doer-Schott, 1982), no hallándose en el intermedio, ni en el neural (Leadem y Blask, 1982) y siendo raras en el tuberal (Baker, 1977).

Carretero (1984) y Carretero y col. (1988) han comprobado mediante inmunocitoquímica, que no existe una distribución especial intraglandular apareciendo dispersas por toda la glándula y con variaciones de unos animales a otros.

Con técnicas de inmunohistoquímica se pueden diferenciar 2 poblaciones de células productoras de Prolactina: Las menos frecuentes son unas células poliédricas, con una gran cantidad de gránulos en su interior, ocupando casi todo el abundante citoplasma y distribuidas por casi toda la glándula, sobre todo cerca de los capilares. El otro tipo son células con pocos gránulos de secreción, dispuestos sobre todo a nivel yuxtannuclear y alrededor del aparato de Golgi. Son las más abundantes, están localizadas en las porciones posterolaterales y se cree que son células activas que liberan la hormona, mientras que a las otras se las considera como células de almacenamiento, con lo que más que 2 tipos celulares distintos se podrían considerar como 2 situaciones de actividad diferentes. Las células de almacenamiento son más abundantes en la infancia y adolescencia, mientras que las células activas lo son en la edad adulta.



A microscopía electrónica, este tipo celular se caracteriza por poseer un núcleo oval o redondeado, rico en cromatina, situado centralmente y, en muchas ocasiones, con nucleolo evidente (Aumuller y col., 1978).



El citoplasma contiene gránulos de secreción de una densidad homogénea y de un tamaño de unos 600-800 nm (los más grandes de las células hipofisarias en la mayoría de las especies). Dichos granos se consideran como portadores de la hormona Prolactina (Kwa y col., 1969; Zanini y col., 1974; Giannattasio y col., 1975), tal y como se pudo comprobar posteriormente por inmunocitoquímica (Tougaard y col., 1980).

Básicamente pueden diferenciarse dos grupos de granos, que están muy en relación con la actividad celular. Los llamados granos inmaduros (100-200 nm) están situados, fundamentalmente, en el área golgiana, son redondeados, ovals, polimórficos o arrosariados; presentan un centro denso con un espacio claro entre él y la membrana limitante. Los granos maduros, son grandes (800 nm), ovals o polimórficos; presentan un contenido que ocupa toda la vesícula y se encuentran esparcidos por todo el citoplasma o agrupa dos en alguno de los polos, generalmente el vascular.

El aparato de Golgi se localiza en los alrededores del núcleo y su tamaño y morfología varía dependiendo del sexo y del estado de secreción; en general está formado por varios dictiosomas (de 3 a 6) que contornean una zona central con vesículas y granos de secreción recién formados. En las ratas macho está poco desarrollado y es relativamente pequeño (Herbert y col 1977).

El retículo endoplásmico rugoso aparece bien desarrollado (Nakane, 1970 y 1975; Moriarty, 1973). En ratas machos normales se dispone en cisternas paralelas y aplanadas, apiladas en un polo de la célula (Saunders y col., 1983) y, en las hembras, lo hace de forma regular, en membranas paralelas que ocupan aproximadamente el 8% del área

celular (Aumuller y col., 1978; Herbert, 1980); en la fase de proestro se forman acúmulos externos con cisternas dilatadas que, ocasionalmente, constituyen imágenes espiroideas de Nebenkern (Leadem y Blask, 1982), y están distribuidas por todo el citoplasma entre los granos de secreción (Aumuller y col., 1978). Contienen un gran número de microtúbulos que se cree juegan un papel en el desplazamiento de los gránulos de secreción por el citoplasma.

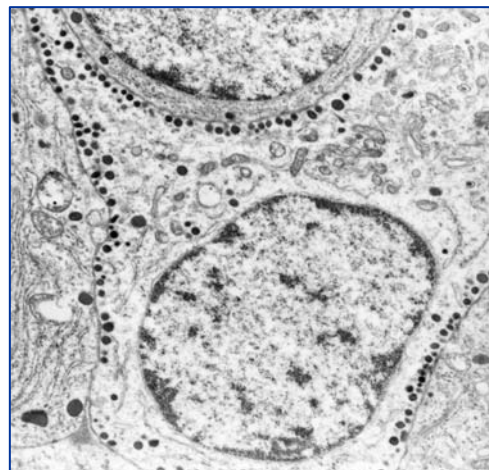
Células opio-córtico-melanotropas.

Este término se usa para definir las clásicamente llamadas células corticotropas, ya que actualmente se sabe que también secretan otros péptidos como LPH, MSH y endorfinas, todas ellas derivadas de la molécula POMC (pro-opio-melano-cortina). Fueron descritas por primera vez por Herlant y Klastersky en 1963. Constituyen des de el 2-5% (Girod, 1984) hasta el 15-20% (Asa y col., 1995) de todas las células de la adenohipófisis. Suelen ser más abundantes en hembras que en machos, aunque Dada y col. (1984) dicen que son más frecuentes en machos. Se localizan sobre todo en la zona anteromedial de los lóbulos laterales de la pars distalis, aunque también en la pars intermedia de la Hipófisis, donde, formando folículos, son las células más abundantes.

Vistas con el microscopio óptico son unas células de tamaño medio-pequeño, basófilas, PAS positivas y con una proporción núcleo-citoplasma muy alta. Son muy angulares con largos procesos citoplásmicos de gran tamaño que se sitúan abrazando las células vecinas y los sinusoides próximos (Watanabe y Daikoku, 1979). Con técnicas inmunohistoquímicas se puede observar que su citoplasma tiene una intensa reacción granular para ACTH (Nakane, 1970). Son muy característicos los conocidos por "cuerpos enigmáticos" que no son sino lisosomas perinucleares que no se tiñen.



Vistas con microscopía electrónica, son células de mediano tamaño, muy similar en los machos y en las hembras y de forma oval o irregular (Girod, 1984). El núcleo suele estar situado en una posición excéntrica y su forma es oval, esférica o a veces irregular. El nucleolo es también esférico y suele estar pegado a la membrana nuclear (Horvath y Kovacs, 1988).



El citoplasma contiene abundantes gránulos de secreción irregulares y pleomórficos. Pueden medir desde 150 a 700 nm, pero la mayoría está cerca de los 200 nm.

El complejo de Golgi puede estar bastante desarrollado dependiendo del estado de secreción. El retículo endoplásmico rugoso está poco desarrollado en condiciones normales, pero en células estimuladas se hipertrofia y se dispone en láminas paralelas. El retículo endoplásmico liso es más abundante que en el resto de las células anterohipofisarias. Las mitocondrias son abundantes y generalmente dispuestas irregularmente alrededor del aparato de Golgi y del núcleo. posee filamentos

intermedios, sobre todo microtúbulos y los llamados cuerpos enigmáticos que son una estructura electrón-densa en su periferia, que hoyes reconocida como un lisosoma debido a que contiene fosfatasa ácida (Horvath y col., 1977). También se pueden observar abundantes ribosomas, tanto sueltos como formando rosetas.

Kurosumi en 1968 diferenció dos tipos de células corticotropas.

El tipo 1 son células con gránulos de secreción pequeños y se cree que corresponden a células de almacenamiento. El tipo 2 son células con gránulos de mayor diámetro y se cree que son células liberadoras.

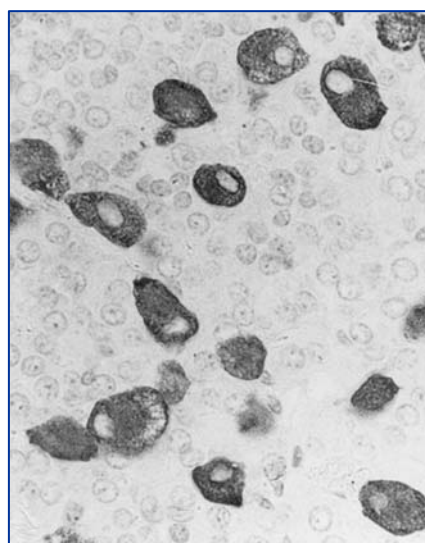
Células gonadotropas.

Las células gonadotropas o secretoras de gonadotropinas son la extirpe celular más abundante en la adenohipófisis después de las células somatotropas y lactotropas, constituyendo cerca del 20% de la celularidad de la glándula y en las ratas varía su número con el sexo, la edad y el estado hormonal (Horvath y Kovacs, 1988). Además, su tamaño es más grande cuanto mayor es el nivel de LH circulante, es decir, en el pico preovulatorio de LH, y disminuyen de tamaño después de éste. Se pueden observar de una forma difusa por toda la pars distalis, y sobre todo en la pars tuberalis donde componen el tipo celular más abundante (Asa y col., 1983).

En la rata parece existir una zona rica en células gonadotropas llamada zona sexual, que parece estar situada en la región cráneo-ventral de la pars distalis (Purves y Griesbach, 1951), aunque otros autores observan mayor densidad en la región craneodorsal (Yoshimura y col., 1981).

Baker (1975) observó que, además de la zona sexual situada cerca de los vasos portales largos, existe otro acúmulo celular en forma de bandas a ambos lados de la pars intermedia, muy probablemente en la vecindad de los vasos portales cortos.

Son células basófilas y PAS positivas. Por técnicas de inmunohistoquímica se puede observar una reacción en el citoplasma para LH y FSH, lo que nos indicaría que son producidas por la misma célula. Sin embargo, no todas las células producen ambas hormonas al mismo tiempo, sino que esta producción depende de las necesidades del organismo.

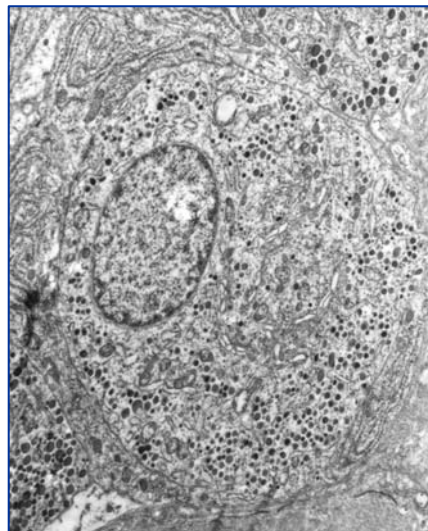


Aunque Farquhar y Rinehart (1954) diferenciaron 2 tipos celulares por microscopía electrónica, las células tipo 1 o FSH y las tipo 2 o LH, hoy se admite que es una sola población celular con variaciones dependiendo del sexo. Suelen localizarse alrededor de los capilares y son más abundantes en la superficie próxima a la pars intermedia, en la llamada zona sexual o zona gonadotropa. También son más abundantes en la zona central de los lóbulos laterales.

Tienen un cuerpo alargado u oval con un núcleo esférico de localización excéntrica. El retículo endoplásmico rugoso es abundante, dilatado y contiene una sustancia electrón-transparente. A diferencia de otras células como las somatotropas, las lactotropas o las corticotropas, su distribución no es paralela, sino que se distribuye irregularmente. El

aparato de Golgi está bastante desarrollado y generalmente localizado en el centro de la célula. Cerca del aparato de Golgi se pueden observar gránulos de secreción inmaduros.

Los gránulos de secreción se distribuyen irregularmente por el citoplasma y son redondeados. Se pueden distinguir dos tipos, uno pequeño (entre 100 y 200 nm) y electrón-denso y otro más grande (aproximadamente 500 nm) y menos electrón-denso, aunque estas características pueden variar dependiendo del método de fijación empleado. La distribución de estos 2 tipos de gránulos muestra un marcado dimorfismo sexual ya que en los varones predominan los gránulos pequeños, mientras que los grandes lo son en las hembras. Por inmunomarcaje para microscopía electrónica se pueden observar tanto LH como FSH dentro de la misma célula y, a veces, dentro del mismo gránulo.

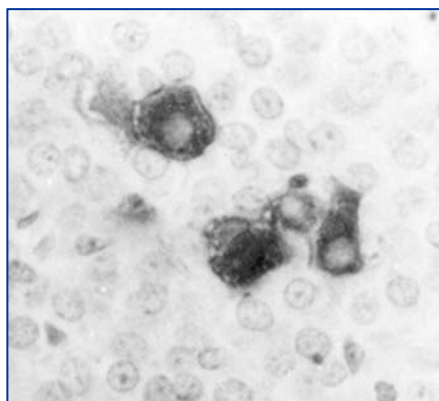


Es posible observar la presencia de ribosomas libres, así como de lisosomas, cuerpos multivesiculares, centriolos o incluso cilios.

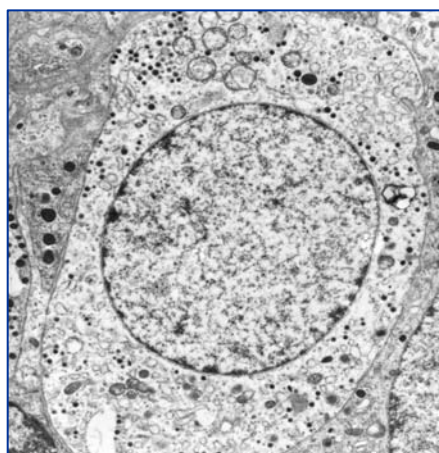
Células tirotropas.

Este fue el primer tipo celular hipofisario definido por microscopía electrónica (Farquhar y Rinehart, 1954). Son poco abundantes, constituyendo aproximadamente el 2-3% de toda la población adenohipofisaria, situándose fundamentalmente en el área anteromedial.

Por microscopía óptica se pueden observar unas células de tamaño medio-pequeño, basófilas y PAS positivas y que con técnicas inmunohistoquímicas expresan una reacción granular positiva para TSH. Tienen una forma angulosa con largas prolongaciones citoplásmicas.



Observadas con microscopía electrónica suelen ser pequeñas, con una forma poligonal, un núcleo esférico que puede estar localizado central o excéntricamente (El Etreby y Fath El Bab, 1978) y en el que suele ser visible un nucleolo. El citoplasma suele ser electrón-transparente, pudiendo existir algún grado de vacuolización. La matriz citoplásmica contiene numerosos ribosomas libres y, ocasionalmente, centriolos, vesículas cubiertas y microtúbulos aislados. Dentro del citoplasma están



los gránulos de secreción que generalmente tienen una forma esférica y son escasos en número, electrón-densos, aunque de forma variable, miden entre 100 y 140 nm de diámetro y frecuentemente están alineados con el plasmalema (Costoff, 1973; Dexlex y col., 1976; Girad, 1984).

El aparato de Golgi está bastante desarrollado, es globuloso y constituido por cisternas aplanadas y está situado cerca del núcleo (Girad, 1984). En sus proximidades se pueden ver gránulos de secreción de reciente formación. El retículo endoplásmico rugoso aparece bien definido y de aspecto vesiculado (Farquhar y Rinehart, 1954) y suele estar distribuido por el citoplasma de una forma irregular (Farquhar y col., 1975).

Células folículo-estrelladas.

Dentro de la adenohipófisis existe un tipo celular que no expresa inmunorreactividad a ninguna hormona. Son las llamadas células folículo-estrelladas aunque durante mucho tiempo se las consideró como 2 tipos celulares distintos (Rinehart y Farquhar, 1953; Kagayama, 1965; Farquhar, 1971; Vila-Porcile, 1972, 1973). Estas son unas células agranulares que expresan de una manera específica la proteína S-100 (Shirasawa y col., 1983) y algunas también son inmunorreactivas a la GFAP -proteína fibrilar ácida glial- (Hofler y col., 1984; Girad y col., 1985).

Primero se pensó que las células folículo-estrelladas eran de origen neuroectodérmico, ya que la proteína S-100 es una proteína específica del sistema nervioso (Cocchia y Minami, 1980; Nakagima y col., 1980). Allaerts y col. (1996 Y 1997) han observado, sin embargo, que estas células son heterogéneas en relación con su aspecto ultraestructural y la expresión de los marcadores CD. Giometto y col. (1997) estudiaron los marcadores de la línea monocito-macrófago y vieron que no se expresaban, lo que da un poco más de consistencia al posible origen neuroectodérmico de las células folículo-estrelladas.

Como su propio nombre indica, estas células tienen una forma estrellada y una organización folicular. Engloban a cavidades bien definidas en el centro de los cordones de la adenohipófisis. Esto hace que se distingan, dentro de cada célula, dos polos: Por un lado el polo luminal, donde se pueden ver microvilli e incluso algún cilio. Las paredes laterales de este polo están fuertemente unidas para sellar esta cavidad. El polo apical es donde se originan las prolongaciones que se encuentran abrazando a las distintas células granulares adenohipofisarias, llegando hasta las láminas basales que separan las células epiteliales de los espacios perivascuales. En una visión tridimensional formarían una especie de funda donde residen las células granulares de la pars distalis .

Vistas con microscopio electrónico son células que no tienen ningún tipo de gránulos de secreción. El núcleo es irregular y está rodeado de un pequeño anillo de citoplasma. Casi no tienen organelas, el aparato de Golgi es pequeño y localizado en el polo apical; las mitocondrias son pequeñas, los lisosomas escasos. Sin embargo están llenas de filamentos, con microfibrillas y microtúbulos sobre todo en el polo apical.

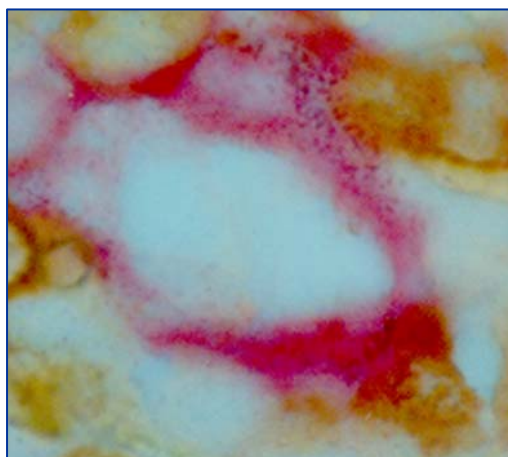
No se sabe cual es la función de esta estirpe celular. Muchos autores han pensado que tienen un papel de sostén debido a su estructura tridimensional, sus uniones intercelulares y su abundante citoesqueleto (Schechter, 1969; Svalander, 1974); este papel podría ser similar al que otras células S-100 positivas tienen, por ejemplo, en la médula adrenal o el cuerpo carotídeo.

Otros autores apuntan la posibilidad de que estas células tengan propiedades contráctiles. Se apoyan en la prominencia de los filamentos (Schultz y col., 1979; Batten y col., 1975) y también en la emigración hacia la periferia que estas células experimentan en los cultivos (Hopkins y Farquhar, 1973). Estos movimientos podrían ocurrir durante la fagocitosis (Perryman y col., 1980).

Es aceptado el papel que las células folículo estrelladas juegan en la fagocitosis tanto *in vivo* como *in vitro* (Schultz y col., 1979; Svalander, 1974; Yamashita, 1969; Rawdon 1978; Yamashita, 1972).

También se ha visto que tienen capacidad endocítica (Perryman, 1980; Leatherland y Percy 1976; Perryman, 1975), así como que están implicadas en el intercambio y transporte de sustancias producidas en la Hipófisis (Abraham y col., 1976).

El papel al que en la actualidad se da más importancia es el que juega en la regulación paracrina (Baes y col., 1987). Se ha observado que producen interleucina 6, que es una citoquina que participa a nivel local en la regulación hormonal (Vankelecom y col., 1989). También se han visto implicadas como fuente de producción, a nivel hipofisario, del factor de crecimiento de fibroblastos y del factor de crecimiento endotelial vascular (Ferrara y col., 1987).



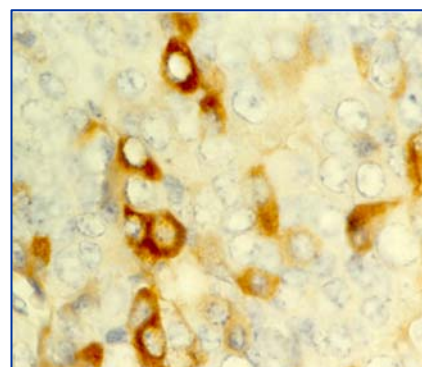
Además de las células folículo-estrelladas, existe otro tipo de células agranulares, situadas en el epitelio marginal, llamadas células marginales y que, al igual que las células folículo-estrelladas, expresan la proteína S-100 (Shirasawa y col., 1983).

Células productoras de péptidos.

Se sabe desde hace tiempo que el Hipotálamo es uno de los principales lugares donde se producen distintos neuropéptidos que más tarde, vía sistema porta hipofisario, van a actuar sobre la adenohipófisis además de en muchos otros lugares (Peillon y col.,

1991). Pero en los últimos años se ha visto que algunos de estos neuropéptidos se expresan en las células adenohipofisarias, no solo *in vivo* en Hipófisis normales y tumorales, sino también *in vitro*, lo que implica que, aparte de la síntesis hipotalámica, se sintetizan también en la adenohipófisis (Peillon y col., 1989; Joubert y col., 1989; Le Dafniet y col., 1989 y 1990). Se cree además que estos neuropéptidos ejercen una acción auto o paracrina en la regulación de la secreción de las hormonas adenohipofisarias (Peillon y col., 1990).

Es bien conocido que los péptidos opioides, del tipo de las β -endorfinas, se sintetizan en las células corticotropas hipofisarias, tanto en el hombre como en la rata. Sin embargo, no ha sido hasta hace bien poco cuando se ha reconocido a la Hipófisis como lugar, no solo de almacenamiento sino también de síntesis de una gran cantidad de neuropéptidos.



De ellos el más estudiado es quizás el péptido intestinal vaso activo (VIP). Fue descrito por primera vez por Said y Mutt en 1970 en el intestino delgado de cerdo. Poco después, esta sustancia se encontró en el sistema nervioso, tanto central como periférico (Larsson y col., 1976; Said y Rosenberg, 1976). Posteriormente lo localizaron en la sangre del sistema porta

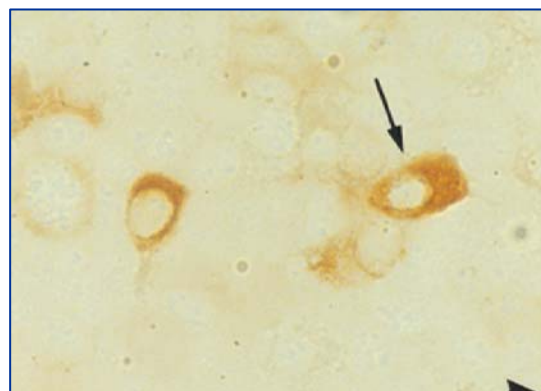
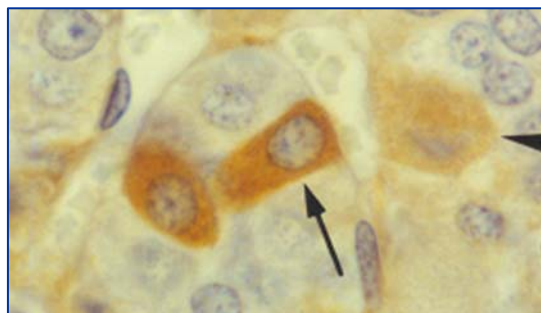
hipofisario (Said y Porter, 1979) y en las células adeno y neurohipofisarias (Fahrenkrug y Schaffalitzky de Muckadell, 1978; Besson y col., 1979; Samson y col., 1979). Pero no ha sido hasta 1986 cuando el equipo de Arnaout demostró que la adenohipófisis era capaz de sintetizar el VIP.

Segerson y col (1989) sugirieron que la síntesis del VIP se producía en una subpoblación adenohipofisaria de células VIPérgicas que se sumaría a las otras subpoblaciones ya conocidas. Actualmente esto está descartado, ya que se ha detectado coexistencia de VIP en células lactotropas (Morel y col., 1982), el resto de las células productoras de hormonas, así como en células gliales (Gil, 1992). Esta reacción se encontraba tanto en el núcleo (en relación con la eucromatina) como en el citoplasma, dispersa en la matriz, sin observarse en las distintas organelas (Morel y col., 1982).

Aunque el VIP se pueda sintetizar a nivel adenohipofisario, se ha visto que estas células VIPérgicas están sometidas a un control hipotalámico (Carretero y col., 1992) y que, al menos en parte, ese control es ejercido por la dopamina (Carretero y col., 1994, 1996). También está implicado el estradiol (Carretero y col., 1995b, 1997).

Entre los neuropéptidos están también los factores/hormonas hipotalámicos moduladores de las hormonas hipofisarias. Así, la CRH ha sido detectada en adenohipófisis por técnicas de hibridación *in situ* (Morel y col., 1982; De Souza y col., 1985). Li y col. (1984) observaron la presencia de GnRH en la adenohipófisis de la rata, y se ha demostrado posteriormente tanto en la rata como en el hombre por hibridación *in situ* (Pages y col., 1992; Dong y col., 1993; Miller y col., 1996). La TRH ha sido vista en cultivos adenohipofisarios de ratas (May y col., 1987), así como en adenohipófisis normales y tumorales (Le Dafniet y col., 1987, 1989) Y se sabe que tiene una expresión diferencial dependiendo del sexo, ya que se expresa más en hembras que en machos (Bruhn y col., 1995).

Carretero y col. (1991) observaron que la GHRH se expresaba inmunocitoquímicamente en la adenohipófisis de ratas normales. El hecho de que ratas tratadas con colchicina (que se sabe que impide el transporte axónico de sustancias), como los estudios realizados *in vitro*, indican que el origen de este neuropéptido está en la adenohipófisis. En ratas se ha detectado su mRNA en la adenohipófisis. En humanos también se ha visto este neuropéptido tanto en Hipófisis normales, *in vivo* (Benlot y col., 1991) como *in vitro* (Joubert y col., 1989; Kawamoto y col., 1995a), así como en adenomas hipofisarios, principalmente somatotropos (Levy y Lightman, 1992; Wakabayashi y col., 1992).



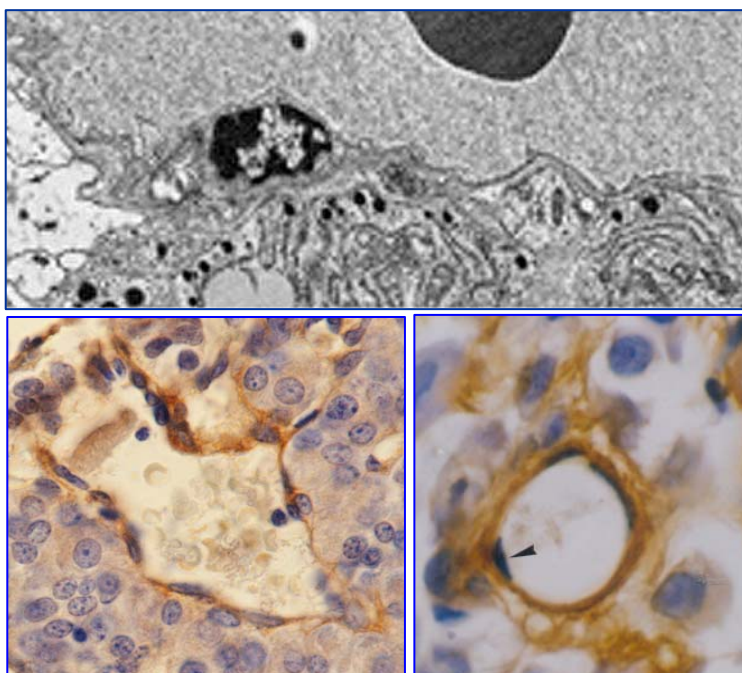
Hay muchos autores que han estudiado la expresión de la somatostatina en la adenohipófisis humana (Joubert y col., 1989; Benlot y col., 1991). Así se ha visto que las hipófisis normales expresan la somatostatina y también su precursor. También se puede

encontrar en células adenomatosas siendo, según Peillon y col. (1997), las células que lo producen distintas cualquiera de las células productoras de hormonas, aunque otros autores (Morel y col., 1983 Mesguichi y col., 1988) observaron que sólo expresan la somatostatina las células somatotropas, tirotropas y lactotropas.

Aparte de los factores hipotalámicos antes descritos, hay un gran número de neuropéptidos que se sintetizan también en la adenohipófisis. Así se ha encontrado que en la adenohipófisis se pueden expresar la vasopresina, tanto de ratas como de cerdos (Chateau y col., 1979), la sustancia P (De Palatis y col., 1982; Aronin y col., 1984), el CGRP (calcitonin-gene related peptide) en las células gonadotropas de rata (Gon y col., 1990), la angiotensina II, probablemente sintetizada en células gonadotropas (Deschepper y col., 1985), así como el angiotensinógeno (Semia y col., 1992); o la bombesina (péptido procedente de anfibios) o su equivalente en mamíferos, el GRP (gastrin-releasing peptide) que ha sido detectada en células tirotropas de rata y en células gonadotropas humanas (Solcia y col., 1987; Steel y col., 1992), siendo células pequeñas, redondeadas y con gránulos pequeños con un halo alrededor (Capela y col., 1978; Timson y col., 1979).

A nivel adenohipofisario, los capilares están formados por un endotelio fenestrado con un espacio subendotelial de escaso grosor, con el fin de permitir a las hormonas adenohipofisarias un fácil acceso a los capilares, y por lo tanto, a la circulación sanguínea general y a los órganos diana (Asa y col., 1995). Histológicamente, estos capilares fenestrados se caracterizan por la existencia de células endoteliales con poros de diámetro variable (500-100 Å). Las células endoteliales, en general, son células muy aplanadas, en las que hace relieve el núcleo, con pocos orgánulos celulares y suelen estar asentadas sobre una membrana basal de 600 Å de espesor (Carrascal, 1983).

Estas células son capaces de producir factores paracrinos como la interleucina 1 β (Carretero y col., EJA) o enzimas como la aromatasa P450 (Carretero y col., 2002).



Hormonas adenohipofisarias.

A continuación realizaremos un breve análisis de las diferentes hormonas secretadas por la adenohipófisis, dejando para el final a las gonadotrofinas, por ser la LH objeto de nuestro trabajo, a las que analizaremos en mayor profundidad.

TSH, tirotropina u hormona estimulante del tiroides.

La TSH es una glucoproteína producida por las células tiotropas de la adenohipófisis. La TSH junto con la LH, la FSH y la CG (gonadotropina coriónica) tienen un origen común. Son heterodímeros compuestos por una subunidad α , que es común, y una subunidad β , que es específica de cada una (Wondisford y col., 1988).

La producción y liberación de TSH por parte de la hipófisis se regula principalmente desde el hipotálamo, a través de la TRH (Kim y col., 1995). La TRH (hormona liberadora de tirotropina) es un tripéptido que se secreta desde las neuronas del núcleo paraventricular, donde tienen su cuerpo y cuyos axones alcanzan la eminencia media. La TRH se va a unir a un receptor. Se han descrito dos subtipos, aunque en humanos sólo se encuentra el subtipo 1. La unión de la TRH a su receptor, va a estimular el fosfoinosítide, que activa la enzima fosfolipasa C, lo que provoca la hidrólisis del fosfatidilinositol, dando lugar a inositol-trifosfato junto a diacilglicerol, lo cual aumentará el calcio intracelular activando las fosfoquinasas. Todo ello conduce a una estimulación de la síntesis y liberación de TSH por parte de las células tiotropas de la adenohipófisis.

El feedback negativo se realiza a través de las hormonas tiroideas. La T₃ que procede en un 20% directamente desde la circulación periférica y en un 80% de la conversión de T₄ a T₃, va a inhibir la síntesis y secreción de TRH, e inhibe también la transcripción de los genes que codifican para la síntesis de TRH.

Otros factores que influyen en la regulación de la TRH, y por tanto de la TSH, son la somatostatina y la dopamina. La somatostatina se ha comprobado in vitro que inhibe a la TRH (Odell y col., 1967). La dopamina va a inhibir la estimulación de TSH por parte de la TRH; por tanto, se ha visto que los inhibidores de la síntesis de dopamina, mejoran la respuesta de la TSH a la TRH.

Por otro lado, la médula oblongata va a tener una participación en la regulación de la TSH a través de la temperatura. Así, ante el frío, se producirá una estimulación adrenérgica, que va a su vez a estimular a la TRH, a través de las neuronas alfa adrenérgicas. El apetito es otro factor que interviene. El núcleo arcuato es el responsable de la liberación de leptina, regulador de la sensación de hambre. La leptina regula la expresión de TRH tanto de forma directa como indirecta a través de POMC (proopiomelanocortina) y otros factores. También el TNF, la interleukina 6 y otros péptidos auto y paracrinos, van a disminuir de forma directa la secreción de TSH.

La TSH, una vez liberada, va a unirse a receptores específicos a nivel de la glándula tiroides, estimulando la producción de T₃ y T₄.

La TSH consta como hemos visto de dos subunidades, la α , y la β , cuyos genes se encuentran en distintos cromosomas. Así los genes de la subunidad α se encuentra en el cromosoma 6, y ésta consta de 92 aminoácidos, mientras que la β está formada por 118 aminoácidos y sus genes se encuentran en el cromosoma 1. La síntesis de la molécula de TSH se lleva a cabo mediante procesos de transcripción, translación, glicosilación,

ensamblaje, combinación y almacenamiento, en los cuales interfieren numerosos transmisores.

La secreción diaria de TSH en una persona eutiroidea está entre 100-400mUI/día, tiene una semivida media de 50 minutos, y un aclaramiento plasmático de 50ml/min (Urman y Critchlow, 1983). En estados hipotiroideos la producción de TSH aumenta unas 10-15 veces, y el aclaramiento disminuye ligeramente. En cambio, en estados hipertiroideos, se suprime la producción de TSH y aumenta notablemente el aclaramiento.

A las 8-10 semanas de gestación es posible ya detectar la TRH, y la TSH entorno a la semana 12. Los niveles de TSH son bajos hasta la semana 18, a partir de la cual aumentan de forma progresiva hasta el nacimiento, alcanzando valores similares a los de la vida adulta alrededor de los 3-5 primeros días de vida.

La secreción de TSH va a seguir dos patrones bien diferenciados. Una secreción pulsátil, que supone el 60-70% del total, y que tiene lugar cada 2-3 horas y una secreción basal, mayor por la noche, que supone el 30-40% del total.

La TSH se une a sus receptor plasmático en la célula tiroidea, lo que activará a la adenilato ciclasa, que activa a las distintas proteínas, y que dará lugar a la producción de T3 y T4. Los efectos de la TSH sobre el tiroides incluyen el desarrollo embriológico de la glándula, su crecimiento, cambios morfológicos en la célula tiroidea, regulación sobre el metabolismo del yodo, síntesis de hormonas tiroideas, además de acciones extratiroideas (Farid y Szkudlinski, 2004).

Las alteraciones en la producción de TSH pueden ser por defecto o por exceso. Por defecto pueden deberse a neoplasias, enfermedades infiltrativas como por ejemplo sarcoidosis, traumáticas o iatrogénicas, como radiación infecciones, enfermedades vasculares o defectos congénitos. El exceso es casi siempre de carácter adquirido, aunque casi siempre se trata de alteraciones específicas de la glándula tiroidea más que de la hipófisis, existen causas hipofisarias muy poco frecuentes como los tumores productores de TSH. También hay alteraciones por exceso congénitas, que originan una resistencia de las hormonas tiroideas a la acción de la TSH.

ACTH o adrenocorticotropina

La ACTH es una hormona polipeptídica que se secreta en la adenohipófisis, y que se compone de un total de 39 aminoácidos. Es secretada por las células corticotropas de la pituitaria anterior, que se caracterizan por ser basófilas. Esta basofilia se debe a su alto contenido en azúcares complejos, como la α -L-fructosa, la N-glyosil-proteína, o la β -galactosa. Constituyen el 10-20% de las células de la adenohipófisis (Doniach, 1985).

El lóbulo intermedio, como se describe en el desarrollo embrionario de la hipófisis es un vestigio rudimentario en humanos. La zona donde se localizaría, que corresponde a la zona de contacto entre la hipófisis anterior y la posterior se denomina zona intermedia, y es rica en células corticotropas. De estas células, algunas llegan incluso a invadir la neurohipófisis, en un proceso que se denomina invasión basófila.

Hay una estructura denominada hipófisis faríngea, que no es más que restos de la primitiva bolsa de Rathke que van a persistir a nivel de la membrana bucofaríngea. Se trata de un tejido con una rica inervación pero una pobre vascularización, y que contiene entre otras células corticotropas que pueden dar lugar a patología (Puy y Ciocca, 1986).

La ACTH se va a expresar en otros tejidos además de en la hipófisis, si bien la mayor parte de su producción se da en ésta. Se encuentra tanto dentro como fuera del sistema nervioso central. En el SNC encontramos las neuronas ACTH, situadas en la base del tercer ventrículo. En menor cantidad se encuentra ACTH y otros péptidos relacionados en la sustancia negra, a nivel periventricular y en el hipocampo. Fuera del SNC, y por orden descendente de abundancia, se encuentra en glándulas suprarrenales, testículos, células mononucleares, bazo, riñón, ovario, pulmón, tiroides, hígado, colon y duodeno.

La ACTH deriva de un precursor denominado POMC (proopiomelanocortina), que consta de 266 aminoácidos (Jenks, 2009).

La regulación de la síntesis y secreción de la ACTH va a constar de una regulación positiva, principalmente a cargo de la CRH (hormona liberadora de corticotropina), y de un feedback negativo a cargo de los glucocorticoides.

La CRH es liberada por el hipotálamo, y va a estimular la liberación y la síntesis de la ACTH. Lo hace tanto de forma directa como indirecta. La CRH se libera como respuesta al estrés, a un patrón de ritmo circadiano, y a los niveles de glucocorticoides (Aguilera y col., 2001).

Otras moléculas, como la interleucina-1, van a estimular a las neuronas noradrenérgicas que aumentan la secreción de CRH, sobre todo a nivel de la eminencia media. La CRH se va a unir a su receptor en el lóbulo anterior de la hipófisis. Este receptor se caracteriza por ser de baja capacidad pero de alta afinidad. Existen dos tipos de receptores. El primero se localiza a nivel hipofisario, y el segundo a nivel de cerebro y tejido cardiovascular, y se cree pueda estar en relación con el control de la tensión arterial.

Además de la CRH, también estimulan la síntesis de ACTH otras hormonas como la arginina-vasopresina (AVP), las catecolaminas, la angiotensina II, la serotonina, la oxitocina, el péptido natriurético atrial (ANF), la colecistoquinina, y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), entre otros (Gaillard y col., 1988).

Las acciones de la ACTH van a recaer fundamentalmente sobre la regulación de la síntesis de esteroides en las glándulas suprarrenales (Miller y Strauss, 1999).

También regula la endocitosis de lipoproteínas en las células adrenales, participa en la hidrólisis del colesterol (por activación de la colesterol-esterasa, o por inhibición de la colesterol-acyl-transferasa), y estimula el transporte de colesterol a la mitocondria.

A largo plazo su efecto fundamental es el aumento de la síntesis de esteroides. Provoca hipertrofia de las glándulas adrenales, si bien es incierto su papel sobre la mitogénesis y la hiperplasia de la glándula. Participa, junto a otras hormonas y moléculas, en la llamada “adrenarquia” (término acuñado por Albright en 1947) que hace referencia al desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. Es un modulador de la secreción de andrógenos. Además, la ACTH es responsable de efectos no adrenales, como un efecto lipolítico. Tiene también acción sobre el comportamiento y el estado psicológico.

La secreción de ACTH se produce mediante ritmos circadianos, con un pico máximo entorno a las 6 horas, y un mínimo a las 18 horas y otro a las 22 horas. La secreción pulsátil es distinta en hombres que en mujeres. Esta secreción se regula a través del estrés y de una retroalimentación negativa por los glucocorticoides (Dallman, 2005).

Existen dos tipos de feedback, el rápido y el llamado retardado, que a su vez se divide en intermedio y lento. El rápido se caracteriza por disminuir la liberación de ACTH, sin afectar a su síntesis. El intermedio va a disminuir la liberación, sin afectar tampoco a la síntesis de ACTH, pero además interfiere con la secreción de CRH. Y por último el lento, que va a inhibir tanto la liberación como la síntesis de ACTH. Existe además otro mecanismo regulador denominado “short feedback”, que consiste en la inhibición directa que realiza la ACTH sobre la secreción de CRH.

Otros factores que van a estimular la liberación de ACTH son: el estrés físico, los estados de hipoglucemia (Ellis y col., 1990), el ejercicio, el ayuno intenso, la hipovolemia, el estrés quirúrgico y el estrés emocional.

Las alteraciones de la secreción de la ACTH pueden deberse a alteraciones en la POMC, que dará patología a cualquier nivel de hormonas que de ella se deriva, como a la deficiencia aislada de ACTH, que es rara, y suele ser adquirida y acompañarse de otras enfermedades autoinmunes. La secreción anormal de ACTH puede deberse a un tumor hipofisario secretor, que dará lugar a la enfermedad de Cushing o al síndrome de Nelson; a un adenoma de hipófisis ectópica, o a un tumor ectópico secretor de ACTH. Existe un síndrome denominado deficiencia familiar de glucocorticoides (FGD) que se caracteriza por unos niveles anormalmente altos de ACTH con una ausencia de cortisol plasmático. Esta rara entidad autosómico recesiva causa una hiperpigmentación, con hipoglucemia, letargia, debilidad e infecciones en quienes la padecen. Otra alteración de la secreción de ACTH es la estimulación anómala de sus receptores, como ocurre en el síndrome de McCune-Albright. Los adenomas hipofisarios, constituyen el 15% de los tumores intracraneales. El 56% de estos adenomas son activos, y de ellos el 10-15% secretan varias hormonas, entre ellas la ACTH y pueden ser responsables por tanto de una alteración en sus niveles.

GH u hormona del crecimiento

El locus responsable de la hormona de crecimiento humana consta de un conjunto de 5 genes localizados en el brazo largo del cromosoma 17 (Chen y col., 1989). Se produce en las células somatotropas de la hipófisis anterior, que se caracterizan por ser altamente acidófilas, igual que las células lactotropas, que en su mayoría provienen de células somatotropas (Behringer y col., 1988). Éstas células responsables de la producción de GH constituyen el 45% de las células hipofisarias. Se localizan en las alas laterales de la hipófisis, y en total contienen de 5-15mg de GH.

La GH es un polipéptido de cadena única que consta de 19 aminoácidos. Se sintetiza, almacena y secreta en las células somatotropas.

La GH es una hormona fundamental para el desarrollo embrionario, y se detecta ya en el primer trimestre de gestación. Hacia la semana 20 se registra un pico con valores en torno a 100-150ng/ml, a partir de ahí, los niveles descienden hasta el nacimiento y durante toda la infancia, hasta la pubertad, cuando vuelven a elevarse (Rudman y col., 1981). La secreción de GH se divide en pulsátil y basal, aunque los niveles basales de esta hormona son prácticamente indetectables. Diversos estímulos favorecen el pulso secretor. Durante el sueño, y asociado al primer episodio de ondas lentas, se produce un pico secretor. Cerca del 60-70% de la secreción diaria de GH se produce durante períodos de sueño (Van Cauter y col., 2000).

Otros estímulos incluyen el ejercicio, a través de un mecanismo de activación colinérgica (Casanueva y col., 1984), y el estrés. El estrés tanto físico como secundario a trauma, hipovolemia, shock, sepsis etc., a través de una activación adrenérgica, es un potente estímulo para la secreción de GH.

También aumentan la secreción la malnutrición y el ayuno. La hipoglucemia inducida por la administración exógena de insulina provoca una elevación de los niveles de GH a los 30-45 minutos, y sigue siendo la prueba gold estándar para el diagnóstico de su deficiencia. La GH también se regula a través de diversos neuropéptidos como la leptina, dopamina, adrenalina, orexinas, y péptidos gastrointestinales.

La regulación hipotalámica de la secreción de GH se realiza a través de la hormona liberadora de GH (GHRH), que se secreta en las neuronas del núcleo arcuato y área premamilar. Su configuración es muy similar a la de los péptidos gastrointestinales (como por ejemplo sustancia p, colecistoquinina, etc.,) y de ahí que éstos actúen como estimuladores de la secreción de GH.

Las principales acciones derivadas de la unión de la GHRH a su receptor van a ser el estímulo de la síntesis, secreción y transcripción génica de la GH. Además, la GHRH va a facilitar la respuesta de la GH a diversos fármacos. La disminución de los niveles de hormona de crecimiento asociados a la edad se debe fundamentalmente al descenso de la GHRH, en un proceso denominado somatopausia (Russell-Aulet y col., 1999).

En cuanto a la regulación negativa, la somatostatina va a inhibir la secreción de GH y de GHRH, pero no su síntesis. La somatostatina es un péptido que se secreta en el hipotálamo, a nivel del núcleo periventricular y que llega a la hipófisis a través del sistema de circulación portal. Se encuentra además a nivel de páncreas, aparato digestivo, sistema nervioso central y células epiteliales. Esta molécula tiene una vida media de 2-3 minutos y su función es la de inhibir la secreción de GH, ACTH y TSH, además de disminuir la secreción de TSH debida al estímulo de TRH, y de insulina por estímulo del glucagón, y bloquea la respuesta de GH a diversos fármacos. Por tanto, el eje somatostatina-GHRH se encarga de la regulación de la secreción pulsátil de GH.

A nivel periférico, los niveles de GH se modulan en función de los niveles de factor insulínico tipo 1 o IGF-1, que va a ejercer un feedback negativo sobre la secreción de GH. Por un lado inhibe directamente su secreción y por otro estimula la de somatostatina. Existe además un mecanismo de autorregulación de GH, que se ha comprobado al objetivar que tras la administración crónica de GHRH, los niveles de GH disminuyen por desensibilización. Es más, la propia administración de GH va a provocar una caída de su liberación por GHRH y la estimulación de la secreción de somatostatina /Davis y col., 1986). La GHRH inhibe su propia secreción y estimula la de somatostatina.

Existen una serie de moléculas denominadas GH secretagogos, que van a estimular la liberación de hormona del crecimiento por vías distintas a la de GHRH-somatostatina. Su uso fundamental es en el diagnóstico de déficit de GH (Casanueva y Diéguez, 1999).

La GH a nivel de circulación periférica se va a unir a las llamadas proteínas de unión o anclaje (BPs). Se han identificado dos tipos de GHBPs, de alta y baja afinidad. Su función es aumentar la vida media plasmática de la hormona, y su déficit es el causante de la resistencia a GH (como ocurre por ejemplo en la raza pigmeo). Las acciones periféricas de la GH se llevan a cabo al unirse ésta a su receptor y activar la cascada de la fosforilación;

que desemboca en la síntesis de IGF-1, y que es la principal molécula que va a intervenir en los procesos de crecimiento. Las acciones paracrinas de la GH incluyen: la estimulación del crecimiento óseo longitudinal y condrogénesis (Gevers y col., 2002), la osificación endocondral (Nilsson y col., 2005), el remodelamiento óseo, activación de procesos metabólicos de lipólisis, anabolismo, síntesis proteica y acción antinatriurética. El déficit de GH se asocia a un incremento de riesgo cardiovascular.

En cuanto a la patología derivada del déficit de GH, puede ser debida a múltiples etiologías. Desde procesos congénitos, bien idiopáticos, genéticos o alteraciones embriológicas, a procesos adquiridos como radiación, traumatismo, leucemia, procesos infecciosos, vasculares, cirugía, hemocromatosis, enfermedades autoinmunes o infiltrativas.

PRL o prolactina

La PRL tiene su origen en las células lactotropas de la adenohipófisis, que suponen un 15-25% del total de células de la hipófisis anterior.

Los niveles de PRL son similares en hombres y en mujeres, esta similitud no varía con la edad (Halmi y col., 1975). El gen que codifica para la PRL pertenece a la familia de somato-PRL, que incluye la GH, el lactógeno placentario, las hormonas PRL-like, y se encuentra en el cromosoma 6.

Entre los factores de transcripción de la PRL cabe destacar el papel del Pit-1, que es un regulador transcripcional de la síntesis de PRL, y que va a ser el responsable de la diferenciación última de las células somato-lacto-tirotropas, que tienen un origen común y se diferencian para dar lugar a la producción de las distintas hormonas. Por otro lado también están los estrógenos que actúan como estimulador de la síntesis y liberación de PRL y la proliferación de células lactotropas.

La PRL es un proteína que consta de 119 aminoácidos (Sinha, 1995). Su secreción se divide en dos tipos, la rápida y la lenta. Ante los distintos estímulos, el organismo prefiere una secreción de PRL sintetizada de novo, frente a la ya almacenada (Walker y Farquhar, 1980). La PRL va a seguir un patrón de secreción episódica, por lo que una medición de sus niveles de forma aislada carece de valor, y elevaciones leves puntuales no poseen valor diagnóstico, si no que son necesarias mediciones seriadas. Un aumento confirmado de niveles de PRL, generalmente por debajo de los 250mg/ml, responde a causas no hipofisarias. (ej., fármacos) Si se descartan éstas, será necesario realizar pruebas de imagen para valorar patología pituitaria.

Como se ha mencionado, la secreción de PRL es episódica. Los niveles van a aumentar justo tras el nacimiento y luego van a disminuir de forma progresiva hasta la pubertad, cuando aumentan de nuevo. Diversos cambios a lo largo de la vida provocan variaciones importantes en los niveles de PRL. Durante la menopausia la PRL disminuye, mientras que durante el embarazo los niveles aumentan de forma gradual hasta el parto (Rigg y col., 1977). Es en el postparto cuando más altos se encuentran, y permanecerán elevados durante toda la lactancia. La succión del pezón por parte del bebé estimula un pico secretor que ocurre a los 10 minutos tras el fin de la succión (Noel y col., 1974). El estrés es otro factor que modula la secreción de prolactina.

La regulación de la secreción de PRL difiere de la de otras hormonas hipofisarias, ya que el principal estímulo hipotalámico es de carácter inhibitorio. El hipotálamo disminuye la

secreción de PRL a través de los llamados factores inhibidores de prolactina, PIF. Existen también PRF, o factores liberadores de prolactina.

El principal PIF es la dopamina (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001), aunque los estrógenos pueden bloquear de forma parcial su acción (Raymond y col., 1978). Otros PIF son el péptido asociado a gonadotropina (GAP) y el ácido gamma aminobutírico (GABA). Entre los PRFs se encuentran la TRH (Jacobs y col., 1971), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la serotonina, los opioides, el GHRH, la oxitocina, la vasopresina, el sistema renina-angiotensina y otros. La PRL tiene además un sistema de autorregulación denominado feedback corto, mediante el cual modula su propia liberación (Grattan y Kokay, 2008).

En cuanto a las acciones de la prolactina se incluyen aquellas dirigidas fundamentalmente a la preparación para la lactancia. Así, es responsable de un aumento del tamaño de las mamas, de la lactogénesis y de la galactopoyesis (LaMarca y Rosen, 2008). Durante la lactancia es la responsable de regular la síntesis de proteínas de la leche materna, como la beta-caseína, lactoglobulina, lactoalbúmina y proteínas ácidas. También de ciertas enzimas como la lactasa sintetasa, la lipoproteín lipasa y ácidos grasos sintetasa.

La prolactina va a tener además una acción fundamental sobre el eje de las gonadotropinas. El aumento de PRL suprime la secreción pulsátil de LH (Neville y col., 2002), y la síntesis de gonadotropinas. Puede causar oligo-amenorrea, fase lútea corta, disminución de la libido, y galactorrea. La galactorrea es un signo clínico que sugiere una posible hiperprolactinemia. Tiene una incidencia muy variable en la población.

La prolactina tiene también una serie de efectos metabólicos, por un lado estimula el desarrollo de las células beta del páncreas, inhibiendo además su apoptosis, y por otro interviene en la regulación del apetito. Aumenta además la absorción intestinal de calcio, incluso con déficit de vitamina D (LaPensee y col., 2006).

La prolactina es un activador de linfocitos diferenciados en respuesta a infecciones y también es posible que pueda jugar un papel importante estimulando la plasticidad sináptica en determinadas regiones cerebrales como el hipocampo.

Las alteraciones en la secreción de prolactina pueden ser por exceso o por defecto. La hipoprolactinemia aislada es de causa idiopática. Solo existe un caso descrito de déficit exclusivo de PRL (Kauppila y col., 1987) con resto de funciones hipofisarias normales. Generalmente la hipoprolactinemia se da en el contexto de un hipopituitarismo. La hiperprolactinemia se debe a diversas causas. De ellas la más frecuente es la causada por fármacos. También puede deberse a alteraciones hipotálamo-hipofisarias como tumores (el prolactinoma es el adenoma hipofisario funcionante de mayor prevalencia) o enfermedades infiltrativas, casusas neurogénicas, embarazo insuficiencia renal crónica, idiopática, etc.

Gonadotropinas

La hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) son glicoproteínas diméricas responsables de los procesos reproductivos. Su producción tiene lugar en las células gonadotropas de la hipófisis anterior y de ahí pasan a la circulación sistémica y alcanzan los ovarios y testículos. Actúan en las gónadas regulando los procesos de esteroidogénesis y los pasos finales de la gametogénesis (Burns y col., 2002).

Las células gonadotropas se desarrollan en las etapas tempranas del periodo embriológico. Constituyen el 7-15% de las células de la adenohipófisis y se encuentran dispersas a lo largo de la pars distalis. Las células gonadotropas son de tamaño medio, ovaladas, cuentan con un núcleo esférico y prominente, y un gran aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso. Contienen múltiples vesículas en cuyo interior hay gránulos de secreción electrondensos. Existen dos tipos de células, las mono y las bihormonales, en función de si secretan uno o los dos tipos de hormonas (Childs y col., 1990). Las características celulares son similares en mujeres y varones.

La LH y FSH son heterodímeros que constan de dos subunidades, la α y la β . La subunidad α es común a las FSH, LH, TSH y CG, y se compone de 92 aminoácidos. La subunidad β es específica, y para la LH consta de 121 aminoácidos, 111 para la FSH y 145 para la CG. Tanto la subunidad beta de la LH como la de la CH se codifican en el cromosoma 19, mientras que la de la FSH se encuentra en el cromosoma 11.

En el periodo intrauterino, la GnRH u hormona liberadora de gonadotropinas se detecta ya en el hipotálamo en la semana 6 (Clements y col., 1980). La LH y la FSH aparecen en la hipófisis en torno a la semana 10 y son detectables en circulación entre la semana 12 y la 14 (Seminara y col., 1998). Se produce un pico de secreción de gonadotropinas en la semana 20 (Lee, 1998), y a partir de entonces los niveles disminuyen hasta el nacimiento debido al inicio de producción de esteroides sexuales que ejerce un feedback negativo. Tras el nacimiento los niveles vuelven a elevarse y se produce un pico alrededor del 2º-3º mes, y a partir del 6º mes en varones y del primer o segundo año en mujeres las gonadotropinas descienden (Brioude y col., 2010). Este periodo de elevación perinatal es importante porque permite establecer un periodo ventana temprano en el cual es posible el diagnóstico precoz de patología del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Este eje posteriormente permanece quiescente hasta la pubertad cuando se activa de nuevo aumentando los niveles de FSH y LH.

En varones, la FSH actúa sobre las células de Sertoli para estimular la espermatogénesis. La LH actúa sobre las células de Leydig para la producción de testosterona. Además, la FSH va a participar en la diferenciación de los túbulos seminíferos y la LH en el proceso de descenso testicular en el varón. La hCG estimula la producción androgénica y la diferenciación de las estructuras Wolfianas en el varón.

En la prepubertad se inicia un aumento progresivo de los niveles de FSH y LH. Primero se eleva la FSH, y se producen picos nocturnos de LH. La secreción de gonadotropinas de forma pulsátil y cíclica va a determinar en mujeres el ciclo menstrual. Así, durante la primera fase del ciclo, la FSH está elevada, pero no la LH. A mitad de ciclo se produce un pico de LH cuyos valores se elevan por encima de los de FSH, momento en el que tiene lugar la ovulación. Posteriormente en la segunda fase del ciclo, la FSH disminuye y la LH se mantiene elevada.

La regulación hipotalámica se lleva a cabo a través de la GnRH, de factores paracrinos hipofisarios, como activina, inhibina y foliestatina, y por el feedback gonadal.

La GnRH es un neuropéptido que se codifica en el cromosoma 8. Las neuronas de GnRH derivan de la placa olfatoria y migran hacia la parte basal media hipotalámica. Hay una serie de proteínas que coordinan dicha migración y su alteración va a ocasionar un déficit de GnRH y además alteraciones olfativas. (ej. Síndrome de Kallmann) (Bianco y col., 2009).

Los cuerpos neuronales se sitúan en el núcleo arcuato de la zona basal media hipotalámica, y también en el área preóptica del hipotálamo anterior. La GnRH llega a través de los axones a la eminencia media y de ahí, por el sistema porta, a la hipófisis.

Las neuronas de GnRH también proyectan hacia otras áreas cerebrales como: la amígdala, el hipocampo y la sustancia gris periacueductal, y de ahí su influencia en el comportamiento reproductivo.

De gran importancia fisiológica es que la secreción de GnRH tiene carácter pulsátil. La secreción continua de GnRH no es efectiva para estimular a la FSH y a la LH (Crowley y col., 1980). Esta secreción se modula de forma tanto positiva como negativa por diferentes neurotransmisores como la noradrenalina, dopamina, GABA, serotonina, glutamato, opioides y otros.

Las acciones de la GnRH incluyen la regulación de la cantidad y calidad de las gonadotropinas. Se une a su receptor hipofisario aunque también existen receptores a otros niveles. Las alteraciones en este receptor van a causar patología, que va desde la completa ausencia de maduración sexual a fenotipos variables. La respuesta a la GnRH es distinta en función de la amplitud, frecuencia y duración del pulso de su secreción y varía a lo largo del ciclo menstrual.

La regulación de gonadotropinas a través de feedback se lleva a cabo por las hormonas esteroideas gonadales, que incluyen estrógenos, andrógenos y progesterona.

Los estrógenos van a tener un efecto dual en función del estado reproductivo. Esto hará que en ocasiones actúen como feedback negativo y en otras positivo. Por ejemplo, tras una ovariectomía, disminuye el nivel de estrógenos, lo que va a provocar un aumento de la FSH y la LH, que revierte al administrar estrógenos de forma exógena. Por otro lado en la fase media del ciclo ovulatorio se produce un aumento de estrógenos que desencadena un aumento de LH y FSH por un mecanismo de feedback positivo.

La progesterona va a actuar disminuyendo la frecuencia de los pulsos de gonadotropinas, probablemente por efecto sobre los pulsos hipotalámicos de GnRH. Así, en la fase lútea, el aumento de progesterona hace que los pulsos de LH disminuyan (Soules y col., 1984).

En los varones, los andrógenos van a ejercer un efecto de feedback negativo. El efecto de la testosterona sobre la LH es complejo. In vivo, la administración de testosterona inhibe los niveles de FSH (Winters y col., 1979) pero el efecto a nivel hipofisario es estimulante (Bhasin y col., 1987). Además va a inhibir la LH.

Como tercer componente regulador de las gonadotropinas están los factores paracrinos hipofisarios. Las inhibinas son proteínas diméricas que regulan de forma selectiva la FSH. Las activinas por su parte van a estimular la FSH mientras que la foliestatina la inhibe (Ueno y col., 1987).

La patología derivada de la alteración en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal se denomina hipogonadismo, y puede dividirse en hipo o hipergonadotropo. Los hipogonadismos hipogonadotropos se caracterizan por unos niveles anormalmente bajos de FSH y LH. Las causas congénitas de ésta patología incluyen el déficit de GnRH -que cursa con diferentes grados de infantilismo, retraso madurativo y azoospermia-, el síndrome de Kallmann, mutaciones en el gen de la FSH y LH, y otros síndromes complejos como el síndrome de Prader-Willi o el Laurence-Moon-Biedl.

Otra etiología de los hipogonadismos hipogonadotropos son las causas adquiridas, como la amenorrea hipotalámica, insuficiencia renal crónica, disfunción gonadal, hemocromatosis, neoplasias, hiperprolactinemia, y diabetes insípida, entre otras.

Los hipogonadismos hipergonadotropos pueden deberse a etiología tumoral – generalmente adenomas- a síndrome de ovario poliquístico, idiopático, síndrome de McCune-Albright, malformaciones complejas, etc. Como causas congénitas se describen dos procesos, el síndrome de Turner en mujeres y el síndrome de Klinefelter en varones (Del Valle y col., 2000).

Función biológica de la FSH y la LH en el varón.

Los órganos diana de LH y FSH son las gónadas. En el varón, la función primordial de la LH es estimular la biosíntesis de testosterona por las células de Leydig, estimulando la actividad del complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol y la CYP 17a- hidroxilasa en las células de Leydig (Wu y col., 2007) . La LH mantiene unos elevados niveles intratesticulares de testosterona, que es un aspecto fundamental para la espermatogénesis. La testosterona circulante es también esencial para mantener la función sexual, los caracteres sexuales secundarios y otros procesos fisiológicos dependientes de andrógenos tales como el metabolismo proteico, óseo y mineral, masa ósea, y la masa y función muscular.

La FSH es responsable del inicio de la espermatogénesis. Se une a receptores específicos en las células de Sertoli y se considera esencial para la espermiogénesis , es decir , el proceso de maduración por el que las espermátides se transforman en espermatozoides maduros.

Tanto en ratas como en primates, la testosterona por sí sola puede mantener la espermatogénesis cuando se administra tras la hipofisectomía o la resección del tallo hipofisario. Sin embargo, si la testosterona se da tras un lapso de semanas o meses, es mucho menos eficaz en el reinicio de la espermatogénesis.

Por tanto ambas hormonas, FSH y testosterona, son necesarias para conseguir una espermatogénesis cuantitativa y cualitativamente normal, actuando en diferentes etapas y sitios celulares para optimizar el proceso.

Función biológica de la FSH y la LH en el varón.

Las acciones que ejercen la FSH y LH sobre el ovario se conocen mejor que las que ejercen sobre la gónada masculina.

La FSH juega un papel fundamental en el crecimiento folicular y en el desarrollo del folículo maduro. El inicio del crecimiento folicular puede ocurrir independientemente del estímulo de las gonadotropinas, puesto que ciertos factores de crecimiento juegan un

papel importante en la estimulación de la mitosis de estas células, pero la acción de la FSH es indispensable para la maduración posterior y para la diferenciación de las células de la granulosa (Richards y col., 2010).

El receptor de FSH sólo se expresa a partir del folículo primario, por lo que los folículos ováricos adquieren la sensibilidad a FSH en las etapas más avanzadas del desarrollo. Siendo la responsable de promover el desarrollo del folículo dominante, también inicia el reclutamiento de los folículos que crecerán durante el siguiente ciclo (Themmen y col., 2000).

Durante las últimas etapas del crecimiento folicular, la activina y el estradiol modulan la acción de la FSH (Hunzicker-Dunn y col., 2006; Deroo y col., 2009). La FSH también controla la producción de inhibina y la expresión del receptor de LH en el ovario durante la fase folicular.

La LH es un importante regulador de la síntesis de esteroides ováricos. El pico de LH a mitad del ciclo estimula la reanudación de la meiosis del ovocito, la maduración del folículo y la ruptura del folículo ovulatorio (ovulación). También permite la conversión de la pared del folículo en el cuerpo lúteo (luteinización) (Macklon y col., 2006; Richards y col., 2010) estimulando la expresión de receptores de progesterona en las células de la granulosa del folículo dominante.

En conjunto, la LH y la FSH juegan papeles diferentes pero igualmente importantes en el desarrollo folicular. La FSH es importante en la maduración inicial de las células de la granulosa, incluyendo la expresión de receptores de LH. Y la LH, que actúa inicialmente en las células de la teca, promueve la producción de andrógenos que sirven de sustrato para su aromatización a estrógenos.

EL esquema de la figura 1nX resume el proceso de esteroidogénesis ovárica. De aptida es necesaria la presencia de colesterol que será captado en el folículo. La LH provoca un rápido aumento de colesterol disponible, ya que actúa sobre la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR).

La StAR controla la transferencia de colesterol desde el exterior hacia el interior de la membrana celular, que es una de las etapas limitantes (Jamnongjit y col., 2006).

A continuación, la LH provoca un aumento en la actividad de la enzima que escinde la cadena lateral del colesterol (un complejo enzimático ligado al citocromo P450) y lo transforma en pregnenolona.

Los efectos a largo plazo de la LH incluyen la estimulación de la expresión de genes y la síntesis de un número de enzimas clave en la esteroidogénesis (la 17- α -hidroxilasa y la 17,20-liasa, entre otras).

EL final de la síntesis androgénica en las células de la teca, estimulada por la LH es la producción de androstendiona que pasa al líquido folicular transformándose en **testosterona**.

La testosterona folicular es captada por las células de la granulosa, donde, se transformará en estradiol mediante la aromatasa (Macklon y col., 2006).

En resumen, en el ovario, la LH estimula la producción de estrógenos mediante la síntesis de precursores de andrógenos en las células de la teca, que se aromatizan y se transforman en estrógenos en las células de la granulosa bajo el control de la FSH.

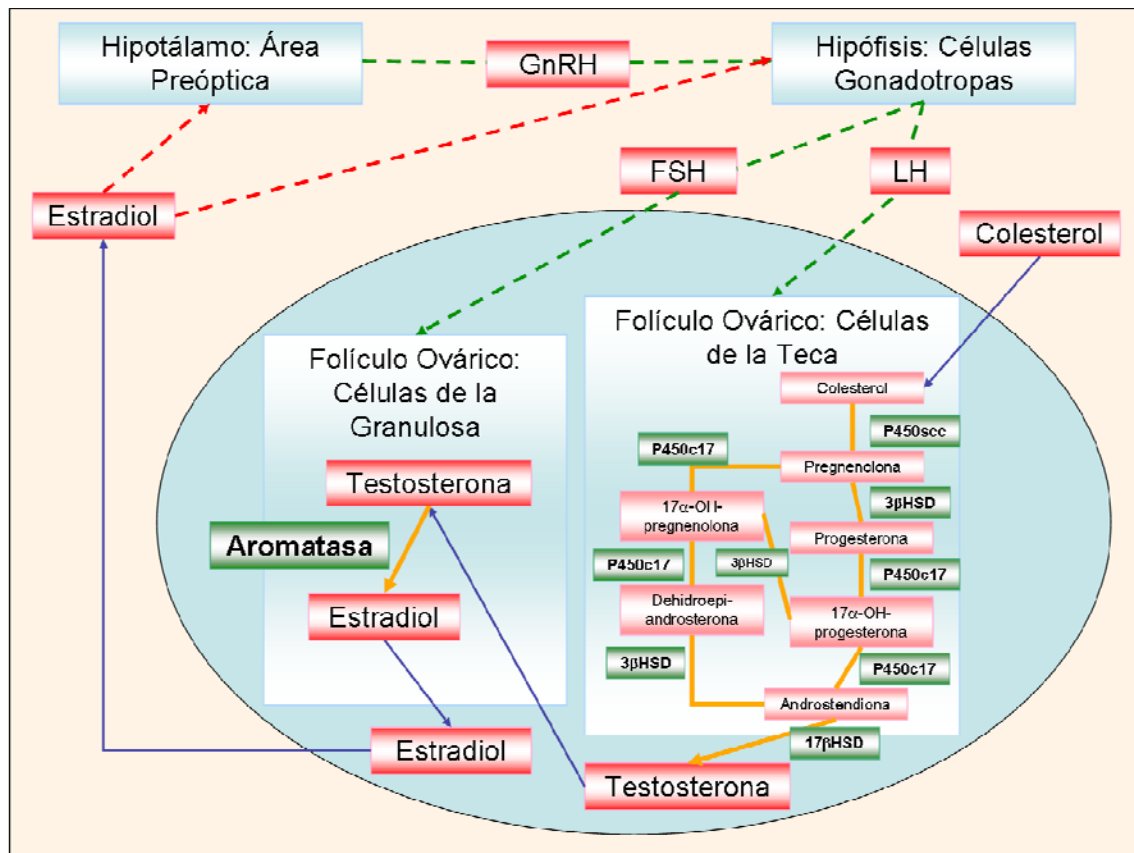


Figura InX. Esquema que resume la ruta sintética intrafolicular de los esteroides gonadales de origen ovárico y la actuación de los estrógenos gonadales circulantes en el feed-back regulador del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en las hembras.

La aromatasa.

La aromatasa P450 es el enzima que cataliza la transformación de andrógenos en estrógenos (Thompson y Siiteri., 1974a). Juega, por tanto, un importante papel en el desarrollo, la diferenciación sexual, la reproducción, la conducta, el metabolismo óseo y lipídico, las funciones cerebrales e incluso en el desarrollo de ciertos cánceres estrógeno dependientes.

La aromatasa P450 es un complejo enzimático microsomal localizado en el retículo endoplásmico, que cataliza la conversión irreversible de andrógenos (C19 esteroides) en estrógenos (C18 esteroides). En esta reacción química el oxígeno molecular da lugar a la pérdida del grupo metilo angular C19 para transformarlo en ácido fórmico, a la vez que se produce la aromatización del anillo A para transformarlo en el anillo fenólico A, típico de los estrógenos (Thompson y Siiteri., 1974b).

La aromatasa P450 representa un punto de control clave en el metabolismo de las hormonas esteroideas ya que es la etapa enzimática limitante de la velocidad de síntesis de estrógenos.

Está compuesta por dos proteínas: una hemo-glicoproteína específica microsomal (citocromo P450 aromatasa) y una flavoproteína microsomal (NADPH-citocromo P450 reductasa). La primera es una monooxigenasa, miembro de la superfamilia citocromo P450, que cataliza la inserción de átomos de oxígeno dentro de moléculas orgánicas para dar lugar a la formación de grupos hidroxilos. La segunda es una flavoproteína microsomal muy ubicua e inespecífica, que transfiere electrones desde el NADPH a cualquier citocromo p450 (Simpson y col., 1994).

La aromatasa P450 es el producto de la expresión del gen CYP19. Este gen está presente en una sola copia en el genoma haploide de la mayoría de los mamíferos y pertenece a la superfamilia de genes P450, formada a su vez por más de 300 miembros repartidos en unas 36 familias de genes (Nelson y col., 1993).

Los diferentes transcritos de la aromatasa derivan de la expresión de los 9 exones del gen, comenzando a partir del exón II. Los promotores son regiones no trasladadas del exón I y varían de unos tejidos a otros (Toda y Shizuta, 1993).

En la placenta la síntesis de aromatasa P450 está dirigida por el promotor I.1 (Jenkins y col., 1993), en el ovario por el promotor II, en el tejido adiposo por el promotor I.4 (Harada y col., 1993), y en el cerebro por el promotor 1f (Honda y col., 1994).

La actividad del promotor PII está regulada por el AMP cíclico y requiere la participación del CREB, el CREM y el factor de respuesta esteroideogénico (SF-1) (Simpson 2000).

En los mamíferos, la expresión tejido-específica de CYP19 se regula mediante el uso de diferentes regiones del promotor y splicing alternativo (Simpson y col., 1994). Esto origina la generación de variantes de transcripción de CYP19 con diferentes regiones 5' no traducidas (UTRs), pero con secuencias de codificación idénticas.

En los seres humanos, se han identificado nueve exones no traducidos, que codifican diferentes 5'UTRs y sus correspondiente regiones promotoras. Las diferentes regiones promotoras y los exones no traducidos abarcan más de 90 kb del gen, mientras que los

exones de codificación están restringidos a 30 kb de la secuencia genómica (Sebastián y col., 2001; Kamat y col., 2002).

En el ratón el locus Cyp19 comprende al menos 60 kb, y se localiza en el cromosoma 9 (Youngblood y col., 1989). La expresión tejido-específica de la aromatasa P450 también se consigue por splicing alternativo y / o uso diferente promotor (Golovine et al., 2003).

Se han identificado las transcripciones derivadas de dos regiones diferentes del promotor. El promotor proximal conservado se encarga de dirigir las transcripciones de ovario, mientras que el promotor situado distalmente es activo preferentemente en el cerebro (Honda y col., 1996; Yamada-Mouri y col., 1996). Todas las transcripciones CYP19 de células somáticas y germinales testiculares derivan del promotor proximal II (Lanzino y col., 2001).

En los ratones, las regiones reguladoras representadas por los exones no traducidos y sus promotores adyacentes ocupan en el locus más que todos los nueve exones de codificación juntos. Esto pone de relieve el complejo mecanismo de regulación transcripcional de este gen. El promotor más distal (Pbr) se encuentra al menos a 31 kb del primer exón de codificación. Esta distancia se corresponde a la estimada para el homólogo humano, el promotor 1.f-específico del cerebro (Sebastián y Bulun, 2001), lo que sugiere el carácter invariable de esta región genómica. En el gen humano, la región del promotor situado más distalmente, que es responsable de la fuerte expresión placentario-específica (PI.1), se encuentra a más de 90 kb anterior al sitio de inicio de la traducción.

La placenta murina no sintetiza estrógenos, pero sí el ovario, el cerebro y los testículos (Harada y Yamada, 1992). En algunos de ellos se coexpresan los genes clave en la biosíntesis de estrógenos, de sus receptores (ER1 (ER- α), ER2 (ER- β)) y el gen Cyp19, lo que sugiere una función paracrina o autocrina local por parte de los estrógenos (Ivanova y col., 2000; Oz y col., 2000; Jones y col., 2000; Miyaura y col., 2001).

Estudios realizados en ratones con disrupción de estos genes han demostrado que la acción de estrógenos es importante para el desarrollo y la diferenciación de los sistemas de reproducción tanto en las hembras como en los machos (Lubahn y col., 1993; Robertson y col., 2001). En estos últimos, incluso, hay evidencia de que en la función gonadal participan los estrógenos que se producen a nivel local por las células somáticas y germinales del testículo (Nitta y col., 1993; Carreau 2001).

Varios estudios han demostrado la expresión de aromatasa en el cerebro de ratón, así como su estrecha proximidad a los receptores estrogénicos (Lephart y Ojeda, 1990; Naftolin y col., 1990). Este hecho sugiere que ciertos efectos biológicos de los estrógenos sintetizados localmente se llevan a cabo mediante la activación paracrina y autocrina de los receptores de estrógenos ER1 o α y ER2 o β pre-y post-sinápticos, y también por medio de proyecciones a núcleos distantes (fundamentalmente en el hipotálamo).

La hipófisis de ratas adultas presenta aromatasa en algunas de sus células y la presencia del enzima es mucho más alta en machos que en hembras (Vázquez y col., 1999; Carretero y col., 1999). Las diferencias de sexo en la expresión de aromatasa en regiones como la amígdala y el núcleo en lecho de la estría terminal sugieren que estos núcleos pueden ser importantes en la diferencia entre el comportamiento masculino y femenino.

Los receptores de estrógenos

Los efectos celulares de los estrógenos se producen mediante la vía clásica a través de los receptores de estrógenos ER1 o alfa y ER2 o beta, que están localizados en el núcleo y el citoplasma de las células diana (Kuiper y col., 1996; Mosselman y col., 1996).

Ambos receptores se distribuyen de manera diferente en los tejidos y juegan papeles fisiológicos distintos. Pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción inducidos por hormonas y que determinan la transactivación de genes estrógeno dependientes (Mangelsdorf y col., 1995; Akingbemi, 2005). Son codificados por dos genes separados (ESR1 y ESR2), pero comparten la arquitectura estructural común de los receptores nucleares y exhiben una estructura de dominio que se ha conservado a lo largo de la evolución (Heldring y col., 2007).

En el dominio central, que es el que se une al ADN, ambos receptores de estrógeno comparten la mayor similitud de secuencia, con una homología del 95%, lo que les permite unirse a elementos de respuesta de ADN idénticos. Los dominios de unión al ligando-C-terminal poseen un 60% de similitud, y son los que permiten que exista especificidad para diferentes ligandos.

El conocimiento exacto del mecanismo de modulación ejercido por el estradiol sobre las neuronas de GnRH es un aspecto clave para comprender la regulación de la fertilidad. Salvo un trabajo aislado realizado en ratas hembras, en el que se encontró un escaso número de neuronas GnRH con ER1 o alfa (Butler y col., 1999), la mayor parte de los estudios, realizados en varias especies y de ambos sexos, han demostrado que las neuronas GnRH no expresan este receptor (Shivers y col., 1983; Herbison y col., 1993, Laflamme y col., 1998),

Por tanto, los estrógenos actúan en las neuronas GnRH por medio del ER2 o beta. Así se ha demostrado en estudios realizados en roedores (Hrabovszky y col., 2001; Temple y col., 2004) y posteriormente en humanos (Hrabovszky y col., 2007).

En roedores, el feedback positivo de los estrógenos sobre las neuronas GnRH es mediado por aferentes ubicadas principalmente en el núcleo periventricular del hipotálamo rostral (Wintermantel et al., 2006), pero el mecanismo y localización celular de la retrorregulación negativa no está tan claro. Se han descrito múltiples y diferentes mecanismos de acción, tales como la regulación directa de las neuronas GnRH, la regulación indirecta trans-sináptica y otros mecanismos mediados por células gliales (Herbison, 1998).

Los estrógenos también ejercen efectos rápidos “no genómicos” que producen una alteración de los mecanismos intracelulares de transducción de señales. Se ha sugerido que podrían estar mediados por receptores de estrógeno extranucleares o por receptores de membrana no clásicos tales como el receptor acoplado a la proteína G (GPR30/GPER), que ha sido identificado como un nuevo receptor de estrógeno (Prossnitz y col., 2009).

A través del GPER, el estradiol actúa rápidamente a tres niveles: activación de la guanilato ciclasa, movilización de los depósitos de calcio intracelular y activación de la

proteín quinasa mitógeno activada (MAPK) y la fosfoinosítido 3 - quinasa (PI3K) (Prossnitz y col., 2008; Lappano y col., 2013).

No obstante, el objetivo común de muchas de estas vías de señalización es la fosforilación de un factor clave de la transcripción, la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB).

En primates, al contrario que en los roedores, el estradiol parece ejercer su acción en las neuronas GnRH a través de este último mecanismo. Sin embargo, son necesarios más estudios para conocer las células diana específicas para la acción de estrógenos a nivel hipotalámico y los receptores implicados.

Hipótesis y Objetivos del Estudio

Antecedentes

La Aromatasa P450 es un enzima que cataboliza el metabolismo de algunos esteroides sexuales, concretamente los andrógenos aromatizables como la testosterona.

La testosterona se metaboliza intracelularmente para desarrollar sus acciones biológicas a través de dos rutas principales (Martini, 1982): por un lado, se transforma en 5 α -dihidrotestosterona por actuación de la 5 α -reductasa; la segunda ruta transforma la testosterona en 17- β -estradiol por actuación de la Aromatasa P450, enzima que forma parte de la macrofamilia del citocromo P450 (CYP19).

Un proceso semejante ocurre en la metabolización de la androstendiona a estrona o de los 16 α -hidroxil-andrógenos a estriol. Los estrógenos, así constituidos en el interior de la célula, interactúan con los receptores estrogénicos, un sistema proteico de receptor totalmente diferente al receptor androgénico (McCarthy, 1994).

La Aromatasa P450 se ha definido como un complejo enzimático, formado por dos componentes: el citocromo P-450 y la NADPH citocromo P450 reductasa, localizado en las membranas del retículo endoplásmico. Es una oxidasa que cataliza una reacción que primero remueve el grupo metilo del carbono 19 de la testosterona como ácido fórmico y, posteriormente, reorganiza el anillo A hacia una estructura aromática. La reacción requiere NADPH y consume tres moles de oxígeno (Khalil et al., 1988).

La secuencia de aminoácidos de la aromatasa P450 fue descrita por Hickley y col. (1990). Dicha secuencia resulta de la transcripción y posterior traslación del gen de la aromatasa CYP 19.

La administración de inhibidores de la aromatasa aumenta los niveles de LH circulante (Boyar y col., 1973; Marynick y col., 1979; Plant, 1986). Esta evidencia, que trataremos de corroborar en nuestro trabajo de Tesis Doctoral, puede deberse a diferentes mecanismos, el primero de ellos es que la esteroidogénesis gonadal, ovario y testículo, de estradiol exige de la aromatización de estrógenos para su producto final. Tal y como se muestra en las figuras HE1 y HE2.

En la gónada, de forma general, la LH actúa estimulando la síntesis androgénica y la FSH activando que los andrógenos aromatizables se transformaran en estrógenos. La ausencia del producto estrogénico final por ausencia de la aromatasa aboliría el feed back inhibitor estrogénico sobre la hipófisis, directo o indirecto, y de esta manera se estimularía la síntesis y liberación de gonadotropinas.

El juego teórico de regulación de feed back entre andrógenos, estrógenos, LH y FSH supone que por actuación de LH se sintetizan y liberan andrógenos que a su vez estimularían la FSH que finalmente sería la responsable de la aromatización de los andrógenos a estrógenos, actuando estos últimos como inhibidores de LH y FSH.

De ser así, la ausencia de aromatasa impediría los efectos finales de FSH y no se produciría la inhibición de LH y FSH por los estrógenos circulantes. Además, los resultados deberían semejantes en machos y hembras.

Al analizar la hipófisis reproductora nos decidimos por estudiar las células positivas a LH pues su producto de síntesis, la LH, sería el inicio del ciclo regulador. También decidimos

estudiar estas células en ambos sexos ya que el estudio de los machos nos permitiría analizar si los niveles de andrógenos circulantes podrían modificar de alguna manera la regulación estrogénica de LH en los machos, valorando así la posibilidad de que el ciclo regulador sea semejante o diferente dependiendo del sexo.

Los efectos sobre la hipófisis, derivados de la ausencia de la aromatasa, podrían ser algo más complejos de analizar ya que además de que la hipófisis sea una glándula endocrina sexualmente dimórfica, cuya secreción se ve afectada por la actuación de los esteroides gonadales; el hecho de que la glándula produzca aromatasa y ésta desarrolle su actuación a nivel local puede ser de especial relevancia en la esfera reproductora.

En nuestro laboratorio, en humanos y en roedores, hemos descrito la expresión inmunohistoquímica de aromatasa en la hipófisis (Carretero et al., 1999a; 2002; 2003). Posteriormente, estos hallazgos han sido confirmados por otros autores en diferentes especies animales (Menuet et al., 2003; Goto-Kazeto et al., 2004; Galmiche et al., 2006a,b; Nocillado et al., 2007; Kadioglu et al., 2008; Trubiroha et al., 2012).

Mediante inmunohistoquímica, desde nuestro laboratorio hemos demostrado (Carretero y col., 1999a) que la aromatasa se expresa en la hipófisis de la rata a partir del día 17 del desarrollo prenatal, siendo las células positivas al enzima más marcadas y numerosas a partir del día 19 y hasta el parto. Estas fechas son inmediatamente posteriores a la diferenciación embrionaria de las células gonadotropas hipofisarias.

La expresión hipofisaria de aromatasa parece guardar una estrecha relación con los periodos sexualmente activos y con las etapas reproductoras. Postnatalmente, hacia la pubertad, en torno a los 21 días de edad de la rata, comienzan a marcarse diferencias entre machos y hembras (Carretero y col., 2003). De esta manera, la expresión inmunohistoquímica de la aromatasa P450 en la hipófisis de la rata adulta es sexualmente dimórfica (Carretero et al., 1999b). Por último, las hipófisis no tumorales de ratas viejas prácticamente no expresan el enzima.

Junto al papel regulador de los esteroides gonadales sobre la síntesis y secreción de diferentes hormonas de la hipófisis, estos esteroides juegan un importante papel regulador en la expresión de la aromatasa hipofisaria de ratas adultas como hemos podido demostrar mediante inmunohistoquímica, western blotting e hibridación in situ (Carretero y col., 2011).

El tratamiento con inhibidores de la aromatasa induce modificaciones morfológicas y en la proliferación celular de algunas estirpes hipofisarias como las células lactotropas (García-Barrado et al., 2014*) o gonadotropas productoras de LH. Los hallazgos anteriores y el hecho de la gran correlación de la expresión en la misma célula hipofisaria de la aromatasa y del receptor estrogénico α (Carretero et al., 2009) sugiere que se está desarrollando un efecto auto-paracrino hipofisario y son sugerentes de un papel definido para la aromatasa hipofisaria.

Al estudiar los efectos que la ausencia total de aromatasa en el organismo tiene sobre la hipófisis reproductora, esperamos poder ofrecer algo de luz en la relevancia que podría tener la aromatasa hipofisaria en la modulación de la función glandular, principalmente en la hipófisis asociada a la reproducción.

Este estudio experimental, se vería claramente enriquecido si se pudiera constatar que lo que ocurre en los ratones knock out ocurre de forma similar en la especie humana. Para

ello, planteamos una primera aproximación que consistiría en la constatación de que mujeres que están siendo tratadas con antagonistas de aromatasa tienen modificados los niveles de LH en sangre.

Objetivos.

Objetivo general:

Determinar la relevancia de la aromatasa hipofisaria en eje reproductor.

Objetivos específicos:

- 1.-Determinar la regulación paracrina desarrollada por la aromatasa sobre las células gonadotropas productoras de LH y los efectos endocrinos sobre dichas células derivados de la ausencia de la aromatasa gonadal.
- 2.-Determinar las repercusiones sobre la liberación de LH del tratamiento con antagonistas de la aromatasa en mujeres.
- 3.-Determinar la prevalencia de adenomas hipofisarios en ratones knock out para el gen de la aromatasa P450.

Material y Métodos

Animales empleados para el estudio experimental.

El Dr. Harada nos cedió gentilmente heterocigotos machos y hembras para poder obtener la colonia de ratones knock out para el gen de la Aromatasa P450.

Todos los animales se mantuvieron en condiciones estándar de estabulario, con temperatura ambiente de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, ritmo de luz oscuridad 12:12 horas, y acceso a la comida (pienso estándar rata/ratón) y la bebida ad libitum.



Figura MM1. Condiciones del estabulario

Dado que los progenitores knock out para la aromatasa son estériles, los animales se obtuvieron a partir de progenitores heterocigotos, de esta manera obtuvimos camadas en las que el 49,66 fueron heterocigotos, el 24,14% fueron wild type y el 26,21% fueron knock out.

Para alcanzar los objetivos propuestos y llevar a cabo el diseño experimental, hemos estudiado 120 ratones (60 por sexo, y de cada sexo, 30 eran wild type [wt] y 30 knock out [ko]). El número elevado de ratones se debió al análisis detallado por edades del desarrollo de adenomas hipofisarios, sacrificando los animales a los 14, 16, 18, 20, 22 y 25 meses de edad (10 animales wt y 10 ko en cada una de las edades, 5 de cada sexo).

Los veinte ratones de 16 meses de edad, 10 wt y 10 ko (5 de cada sexo) fueron empleados para el estudio de las células gonadotropas hipofisarias positivas a LH.

Genotipaje.

La determinación de la delección-sustitución del gen para la aromatasa P450 se realizó mediante PCR. Para ello, cuando los ratones tenían 1 mes de edad, se tomó el fragmento distal de la cola para aislar el DNA.

Extracción, aislamiento y purificación del DNA.

La extracción, aislamiento y purificación del DNA se realizó empleando el kit de Roche(R) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En un tubo de microcentrífuga de 1.5mL y libre de nucleasas se añadieron: de 2 a 5 mm de la cola del ratón, 200μl del tampón de lisis de tejidos y 40 μl de proteinasa K reconstituida.

Se mezcló e incubó durante 3 horas a 55°C .

Transcurrido ese tiempo se procedió a obtener el lisado mediante aspiración-eyección repetida de la muestra, con un jeringa de 1 mL, libre de nucleasas.

Una vez obtenido el lisado, se añadieron 200μl de tampón de unión y 100 μl de isopropanol; para después centrifugar 5 minutos a 13000 xg.

Tras insertar un tubo de alto filtrado en un tubo de recogida, se pipeteó el líquido de la muestra en el reservorio superior del tubo de filtrado. Todo el tubo ensamblado se centrifugó 1 minuto a 8000 xg. Después de centrifugar, se retiró el tubo de filtrado del tubo de recogida y se desecharon el líquido filtrado y el tubo de recogida.

Se colocó de nuevo el tubo de filtrado en un nuevo tubo de recogida y se añadieron, al reservorio superior del tubo de filtrado, 500 µl del tampón inhibidor de remoción, para centrifugar 1 minuto a 8000xg.

Se procedió al lavado de la muestra, para lo que, por duplicado, después de centrifugar y retirar el tubo de filtrado del tubo de recogida y desechar el tubo de recogida y el líquido filtrado, se colocó de nuevo el tubo de filtrado en un nuevo tubo de recogida y se añadieron 500 µl de tampón de lavado al reservorio superior del tubo de filtrado. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 8000x g.

Al finalizar el segundo lavado, se centrifugó durante 10 segundos a velocidad máxima y se desechó el tubo de recogida.

Tras insertar el tubo de filtrado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio y estéril, se añadieron, en el reservorio superior del tubo de filtrado, 200 µl del tampón de elución precalentado y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 xg.

Para los centrifugados se ha empleado la centrífuga para eppendorf Hermle Z233 M-2.

Después de esta sucesión de pasos, el tubo de microcentrífuga contenía ya el DNA eluido que se utilizó inmediatamente o bien, fue almacenado entre 2-8°C o bien entre -15°C y -25°C para análisis posteriores (dependiendo del tiempo a transcurrir hasta la realización del análisis).

Amplificación del DNA purificado, PCR.

Una vez aislado el DNA se procedió a realizar la amplificación del fragmento de DNA para detectar la delección-sustitución del gen de aromatasa P450 por el recombinante,.

Empleando el kit PCR Master mix de Promega®, con un volumen de 5 µl de DNA aislado y empleando como primers:

Superior-Recombinante: ctt ggc tac cat gtt gtt att gtc

Inferior-Silvestre: agc tct gga ggt tta ctt tcc tag

La reacción de amplificación se realizó mediante 30 ciclos (94°C-65°C-72°C) en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler®.

Una vez amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 150mV, utilizando una muestra de 20 µl de cada producto amplificado en tampón de carga, con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se fotografiaron bajo luz ultravioleta.

En todos los casos se incluyó un control negativo sin primers.

La figura MM2 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos tras la electroforesis.

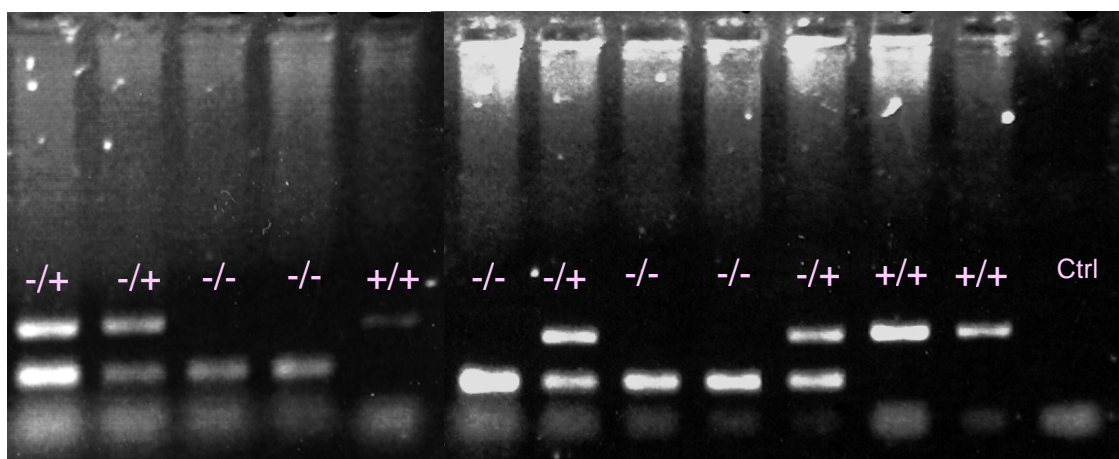


Figura MM2 Electroforesis del DNA amplificado por PCR para el gen de aromatasa P450.

En la imagen se aprecian las bandas de electroforesis obtenidas tras el producto de amplificación con PCR del gen silvestre y el recombinante para Aromatasa P450, de los animales empleados en el estudio. Las flechas amarillas marcan el DNA amplificado por PCR para los ratones wilde type empleados en el estudio y las flechas rosas el de los ratones knock out.

Sacrificio de los animales, Extracción y Procesado de las muestras.

Una vez que los animales alcanzaron la edad de 16 meses, los animales fueron sacrificados por decapitación y, después de la apertura meticulosa de la calota encefálica, se procedió a extraer la hipófisis, mediante disección cuidadosa. Las muestras para el estudio histológico se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (0,1M, pH: 7.4) durante 8 horas.

Una vez fijadas, se lavaron en el mismo tampón durante 4 horas y se procedió a su deshidratación en etanoles crecientes en concentración (70, 80, 96 y 100%).

Ya deshidratadas se procedió a su aclaramiento en benceno para su posterior inclusión en parafinas. La deshidratación, el aclaramiento y la inclusión se realizó en un procesador histológico Leica®.

De los bloques obtenidos se obtuvieron secciones de 5 µm de grosor empleando un micrótopo Microm HM35, que se fijaron con gelatina al alumbre de cromo en portas de vidrio.

Inmunocitoquímica.

La inmunocitoquímica se ha empleado para detectar las células hipofisarias gonadotropas positivas a LH.

Detección inmunocitoquímica de LH.

Los cortes obtenidos se incubaron en estufa a 58°C durante 1 hora, tras lo que se procedió a la desparafinización en xileno y rehidratación en alcoholes decrecientes, terminado el proceso con un lavado en agua destilada y desionizada durante 5 minutos.

Para evitar falsos positivos derivados de la posible existencia de peroxidasa endógena en el tejido, el enzima se bloqueó sumergiendo las muestras en un baño de Metanol-Agua oxigenada al 3% (200ml/30ml), durante 20 minutos.

Transcurrido ese tiempo, las muestras se lavaron, en agua destilada, a temperatura ambiente, mediante 2 lavados de 10 minutos cada uno.

Se acondicionaron las muestras para las sucesivas reacciones, sumergiendo los cortes en tampón TBS (Trizma base, Sigma®, 0.01M, pH 7.4, con 0.09% de NaCl), durante 20 minutos, y, por último, en TBS durante 5 minutos.

Para inhibir reacciones inespecíficas, los cortes se incubaron con suero no inmune obtenido en cabra (diluido 1:30 en TBS), durante 20 minutos.

A continuación, se procedió con la reacción inmunocitoquímica, para lo que las muestras se incubaron con suero policlonal anti-LH obtenido en conejo (Dako®, diluido 1:800 en TBS), a 4°C toda la noche.

Transcurrido el periodo de incubación, los cortes se lavaron 2 veces en TBS de 5 minutos.

El suero policlonal se detectó incubando con suero biotinado de cabra anti Ig G de conejo (Caltag®, diluido 1:150 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

Por último se procedió a incubar con estrepto-avidina-peroxidasa (Caltag®, diluido 1:150 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

El revelado de la reacción se hizo con 3-3'diaminobencidina (Sigma®, al 25% en TB: Trizma base 0.01M, pH 7.4) a la que se añadió un 0.03% de agua oxigenada inmediatamente antes de su empleo.

Tras lavado en agua destilada, las preparaciones fueron contrastadas con Hematoxilina de Mayer y tras su lavado en agua, se deshidrataron y aclararon en etanol-xilol y se montaron con DePeX.

Controles de las reacciones inmunocitoquímicas.

En todas las reacciones se realizaron test de control, para ello, se sustituyó el suero primario específico por suero no inmune de conejo, diluido en TBS a la misma concentración que se diluyó el suero inmune; o bien con suero preabsorbido con LH 10nM durante 12 horas a 4°C,

En todos los casos, no se obtuvo positividad al finalizar el proceso.

Estudio de las muestras.

Una vez desarrollada la reacción inmunocitoquímica, los cortes se estudiaron con un microscopio de luz transmitida Zeiss Axiophot[®], obteniendo micrografías digitales con una cámara digital acoplada, Olympus DP70, y el captador de imágenes DPController v1.1.1.65, a aumentos de x10, x40 y x100.

Morfometría y Densitometría.

Todos los estudios morfométricos realizados en este estudio se hicieron empleando el software libre de NIH Image J.

Para ello se trabajó sobre imágenes digitales a resolución de 300 ppi que se homogeneizaron en brillo-contraste con el software adobe photosop CS5[®], con umbrales de entrada-salida idénticos.

Las micrografías obtenidas por microscopía óptica se obtuvieron con un microscopio Zeiss-Axiophot[®] con iluminación estándar unificada por un estabilizador de corriente en habitación oscura, siendo capturadas con una cámara digital Olympus DP70[®] y el software de captura de imagen Olympus DP Controller v.1.1..1.65[®].

Todo el estudio se realizó con un ordenador dotado de un procesador PentiumV doble cuore (R) y 16Mb de RAM, tarjeta gráfica Nvidia de 5Mb y monitor Sony Bravia de alta resolución.

Las mediciones fueron realizadas a doble ciego, por el doctorando y el director de la Tesis Doctoral, con un error intraensayo de 1.76%.

Los valores obtenidos se expresan en micras cuadradas.

Análisis morfométrico de los cortes histológicos.

Para el análisis morfométrico de los cortes histológicos se eligieron micrografías a partir de secciones transversales de cada animal, bien conservadas en su estructura y separadas al menos por 35 μ m; trabajando a aumentos de microscopio de x100 en zoom de pantalla x3,5.

Fueron requisito de elección de las células a medir el que el contorno celular y el nuclear fueran nítidos en el plano de sección.

En cada sección se trazaron los perfiles del contorno celular y del contorno nuclear de las células positivas a LH, lo que permitió calcular, tras el calibrado dela aplicación Image J, las dimensiones de las áreas celular y nuclear.

De esta manera se midieron 100 células por animal, lo que supuso un total de 500 células por sexo y grupo de estudio. Las células se eligieron por azar y por separado, de cada una de las regiones hipofisarias estudiadas, tal y como se expone al comienzo del capítulo de resultados.

Los valores obtenidos se expresan en micras cuadradas en cada una de las gráficas que aparecen en el capítulo de resultados.

Análisis planimétrico, cuantificación celular.

Para el estudio planimétrico, de cada una de las regiones hipofisarias estudiadas, elegidas conforme a los criterios que se exponen al comienzo del capítulo de resultados, se emplearon micrografías digitales de alta resolución a aumentos de microscopio x40 y 3,5 de zoom de pantalla.

En dichas imágenes se contaron las células positivas y las células negativas a LH, del área a estudiar. De manera que se contaron 4000 células de cada región a estudiar en cada animal. Lo que supuso un total de 20000 células por sexo y grupo de estudio.

Conociendo el total de células se calculó el porcentaje de células positivas a LH. Todos los valores correspondientes a la cuantificación celular, se expresan en porcentaje en el capítulo de resultados.

Análisis Estadístico de los resultados.

Empleando la aplicación Prisma GraphPad, de los valores obtenidos, clasificados por sexo y grupo experimental, se obtuvieron las medidas de centralización (media aritmética) y dispersión (desviación típica y error estándar de la media).

Las diferencias observadas entre los ratones wilde type y los ratones knock out, del mismo sexo, y para cada región hipofisaria estudiada, se contrastaron aplicando el análisis de la t de Student, aceptando como significativos valores menores de $p < 0.05$.

Las diferencias observadas entre las diferentes regiones hipofisarias a estudiar, entre sexos y entre los ratones wilde type y los ratones knock out, para cada región hipofisaria estudiada, se contrastaron aplicando el análisis de la varianza y el test F de Scheffé, aceptando como significativos valores menores de $p < 0.05$.

Determinación de LH en mujeres.

En mujeres que han sido tratadas de cáncer de mama estrógeno dependiente y siguen un tratamiento con antagonistas de la aromatasa p450, en el hospital Puerta de Hierro de Madrid, dentro de sus controles y sin que ello supusiera una analítica a mayores de las habituales, se determinaron por ELISA y quimioluminiscencia los niveles séricos de LH.

La recogida de muestras no implicó nuevas intervenciones terapéuticas o de diagnóstico, ya que se hicieron dentro de las determinaciones analíticas en el seguimiento del proceso cancerígeno. Para ello, se realizó el correspondiente consentimiento informado y se obtuvo el permiso del comité de bioética del Hospital Puerta de Hierro de Madrid.

Modelo de Consentimiento informado para las pacientes incluidas en el estudio.

Título del protocolo: "ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE LA INFLUENCIA DE LOS INHIBIDORES DE LA AROMATASA EN CÉLULAS GONADOTROPAS"

Investigador principal: Dr. Francisco López Sánchez, Servicio de Ginecología y Obstetricia

Sede donde se realizará el estudio: Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda

Nombre del paciente:

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

El tratamiento con inhibidores de la aromatasa produce modificaciones en ciertas células que producen hormonas implicadas en la reproducción (hormonas gonadotropas). Se está realizando un estudio experimental con animales que carecen del gen de la aromatasa, que se vería claramente enriquecido si se pudiera constatar lo que ocurre en la especie humana. Para ello, se plantea realizar la determinación de una de estas hormonas (LH) en las mujeres son cáncer de mama que están siendo tratadas con antagonistas de aromatasa.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Constatar que mujeres que están siendo tratadas con antagonistas de aromatasa tienen aumentados los niveles de LH en sangre.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Profundizar en la relevancia que podría tener la aromatasa en la reproducción.

4. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Se llevará a cabo desde las Consultas de Patología Mamaria y de Ginecología Oncológica (ambas del Servicio de Obstetricia y Ginecología). No se solicitará ninguna muestra adicional, sino que se aprovechará la analítica rutinaria que se le realizará en el seguimiento de su proceso, para añadir una única determinación de LH.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Ninguno. Su muestra se utilizará para este proyecto de investigación básica y no tiene ninguna influencia ni en el manejo ni en el tratamiento de su proceso.

6. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores. No se utilizarán el nombre y apellidos reales, sino que se asignarán códigos para la identificación de las muestras.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con

fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante Fecha

He explicado al Sr(a). _____

la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador Fecha

Aprobación del comité ético para la realización del estudio.

D^a. CRISTINA AVENDAÑO SOLÁ, SECRETARIA DEL COMITÉ ETICO DE
INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE
HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID

CERTIFICA

Que dicho Comité ha evaluado el proyecto de investigación titulado:

**“ESTUDIO SOBRE LAS CÉLULAS GONADOTROPAS EN RATONES KNOCK OUT
PARA AROMATASA.”**

del que es Investigador Principal el Dr. Francisco López Sánchez, considerando
que su planteamiento global es aceptable desde el punto de vista metodológico y
ético. Acta n^o 294.

En Majadahonda, a 23 de diciembre de 2013



Hospital Universitario
Puerta de Hierro
Majadahonda
SaludMadrid
Comunidad de Madrid
Comité Etico de Investigación
Clínica

Fdo.: Dra. Avendaño Solá
Secretaria del CEIC

Resultados

Prevalencia de Adenomas y Prolactinomas hipofisarios.

Los roedores, al igual que la especie humana, con el paso de la edad desarrollan de forma espontánea adenomas hipofisarios. Este hallazgo está suficientemente documentado en la literatura, aunque menos en el ratón que en la rata.

Los adenomas son más frecuentes en las hembras que en los machos y, en éstas, los prolactinomas son el tumor funcional de mayor prevalencia.

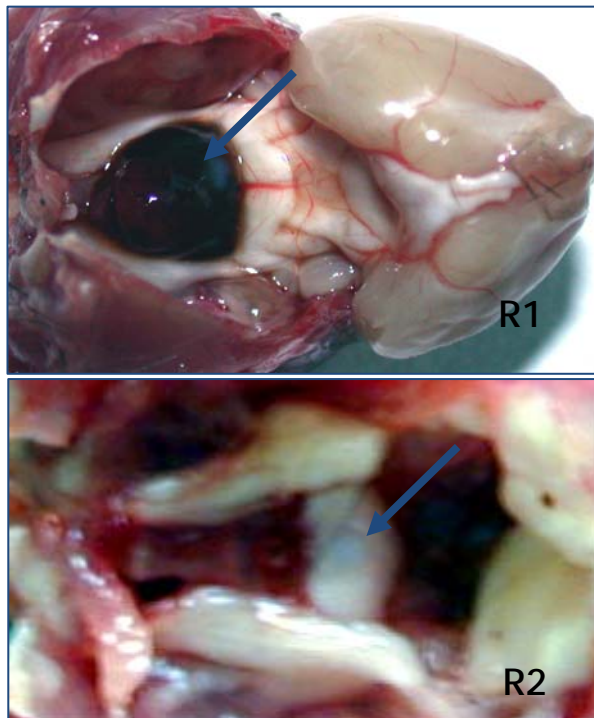
En nuestros ratones hemos podido observar estos mismo hechos. Las hembras wild type desarrollan adenomas hipofisarios que son más frecuentes con el paso de la edad (figuras R1, R2 y R3).

Las figuras R1 y R2 muestran la generalidad de lo observado en las hembras wild type (figura 1) en la que se observa un macroadenoma hemorrágico de la hipófisis (flecha); y de la apariencia absolutamente normal de la hipófisis en las hembras knock out (flecha en figura R2).

En nuestra serie de animales, no encontramos tumores en ninguno de los dos grupos estudiados a los 14 meses de edad. De los 16 a los 20 meses de edad, aparecieron adenomas hipofisarios entre un 20 y un 30% de los ratones Wilde type, pero no en los knock out de aromatasa. Entre el 33 y el 50% de dichos adenomas fueron prolactinomas (figura R3).

A partir de los 22 meses la frecuencia de aparición aumentó. A los 22 meses de edad el 40% de las hembras Wilde type presentó adenomas de los que el 75% fueron prolactinomas. Por último, a los 25 meses de edad, el 60% de las hembras wild type presentó adenomas de los que el 67% fueron prolactinomas.

Al contrario, las hembras knock out de 22 meses de edad no presentaron adenomas y el 10% de las knock out de aromatasa presentaron adenomas, pero estos adenomas siempre fueron adenomas productores de ACTH derivados de la pars intermedia, en la que no se ha descrito que se produzca aromatasa.



Figuras R1 y R2. Fotografía de la hipófisis tomadas en el momento de la necropsia. R1: hembra wild type de 25 meses, R2: hembra knock out de aromatasa de 25 meses.

Como puede apreciarse en las imágenes, señaladas por flechas, en la hembra wild type aparecieron adenomas hipofisarios que no se desarrollaron en las hembras knock out, en las que la apariencia de la hipófisis era normal.

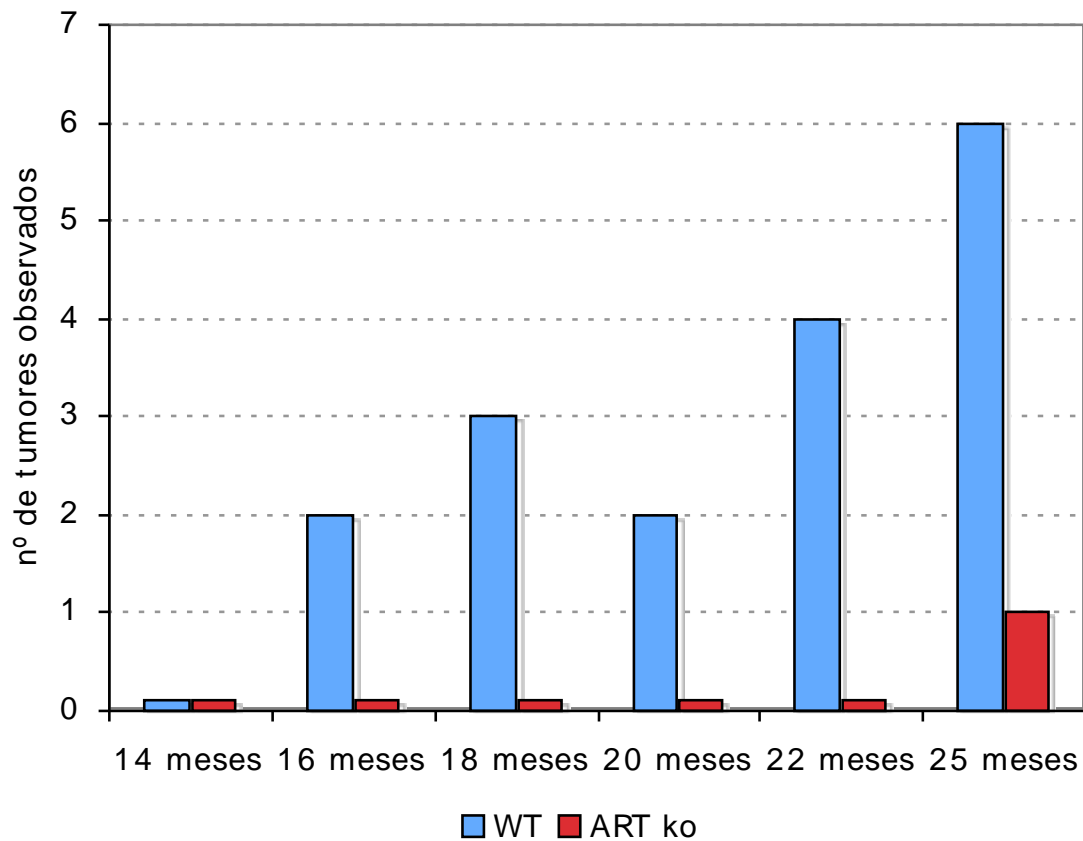


Figura R3. Gráfica que muestra la prevalencia de aparición de adenomas hipofisarios en ratas hembras wild type y knock out.

En azul se representa en número total de adenomas observados en ratas hembras wild type y en rojo el de las knock out. En amarillo se representa el número absoluto de prolactinomas observados en las hembras wild type y en verde el de las knock out. Como puede observarse fácilmente la prevalencia de adenomas es mayor en las hembras wild type que en las knock out y, en particular, en lo que se refiere a los prolactinomas ya que no se observó ningún prolactinoma en ratas hembras knock out.

Hipófisis no tumoral.

Células Gonadotropas positivas a LH en ratones hembras.

Distribución general.

La distribución de las células gonadotropas positivas a LH presenta un patrón bien definido que se mantiene independientemente de si el animal estudiado era wild type o knock out.

Como se muestra en el esquema (figura R4), se distinguen claramente cuatro zonas de marcada densidad:

Una es dorsal y se dispone en torno al receso lateral de la caverna hipofisaria, principalmente en relación con su porción dorsal, parte de la pars distalis que se continuará con la pars tuberalis de la hipófisis (1).

De las tres ventrales, una se sitúa en la parte más ventral de la región medial y suele continuarse con la del lado contrario (2). La tercera condensación también es ventral y se dispone en una escotadura ventral que presenta la hipófisis del ratón en la separación entre la parte medial y la parte lateral de la pars distalis (3). La última, que suele ser la más pequeña de las cuatro, se dispone en el polo más ventral de la región más lateral de la pars distalis (4).

Estas cuatro condensaciones celulares se acompañan de otras tres menos llamativas. Una se dispone siguiendo el margen lateral de la pars distalis (5); otra en el margen dorsal de la porción lateral de la pars distalis (6), y la tercera es ventral a la caverna hipofisaria (7). Además hay células aisladas por la pars distalis (8), siendo muy escasas, a veces inexistentes, en la zona que se dispone justo ventral a la pars intermedia en la región medial de la pars distalis (9).

Este patrón de distribución celular lo iremos utilizando a lo largo de todo este capítulo en la exposición de los resultados obtenidos.

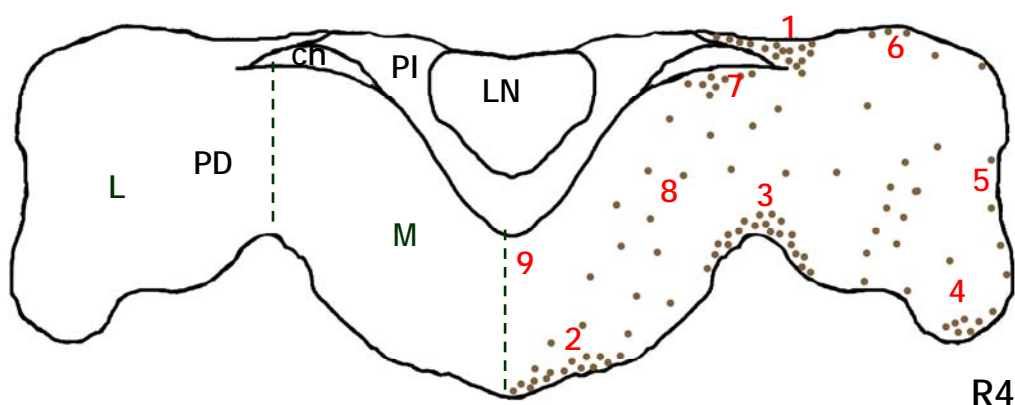
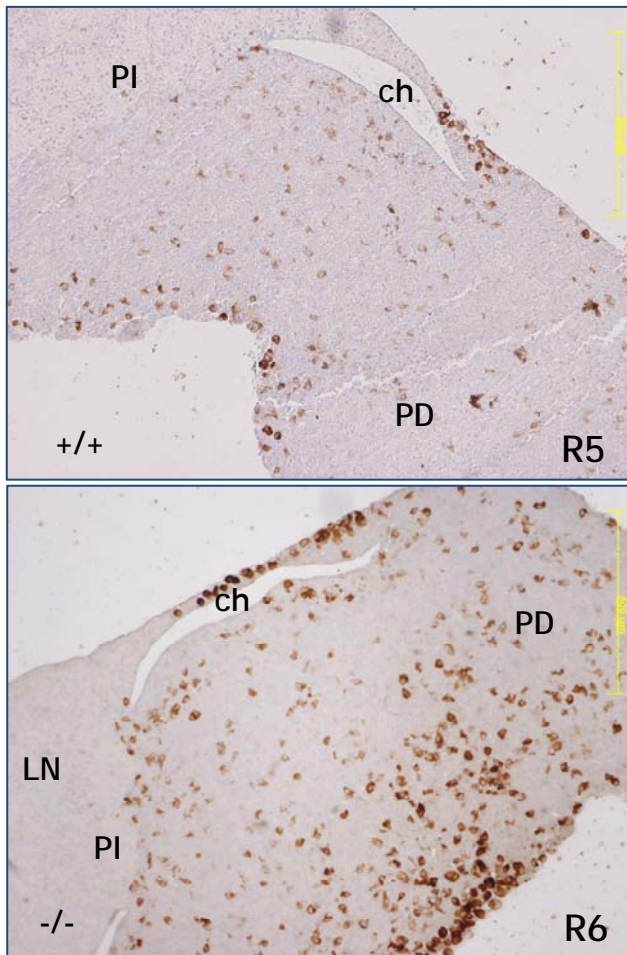


Figura R4. Esquema que representa las diferentes partes de la hipófisis del ratón en un corte frontal. PD: Pars distalis, PI: Pars intermedia, LN: Lóbulo neural, ch: caverna hipofisaria. M: región medial, L: región lateral. En la parte derecha del esquema se representan las condensaciones y la distribución de las células gonadotropas reactivas a LH que se describen en el texto.

Células gonadotropas positivas a LH en las hembras de 22 meses de edad.

El aspecto general de visu que se obtiene al analizar a bajos aumentos la hipófisis de los ratones de 22 meses de edad es que hay menos células y, aparentemente, menos reactividad en los wild type que en los knock out. Como puede apreciarse en las figuras R5 y R6.



Las condensaciones celulares dorsales y ventrales son evidentes en todos los grupos estudiados.

El aumento de positividad aparece principalmente en la intersección de medial a lateral y en la mitad ventral de la hipófisis.

Siendo mucho menos evidente en la región dorsal, a excepción de la parte dorsal que queda dispuesta marginalmente en la proximidad de la pars intermedia, en la que claramente aumenta la positividad a LH.

Figuras R5 y R6. Micrografías que muestran las características generales que se observan en los cortes frontales de la hipófisis de ratones hembras de 22 meses de edad que se describen en el texto.

+/: wilde type (R5).

-/-: knock out (R6).

PD: Pars Distalis, PI: Pars Intermedia, LN: Lóbulo Neural, ch: caverna hipofisaria.

Cuantitativamente, las células positivas a LH fueron significativamente más abundantes ($p < 0.01$) en las hembras knock out que en las wild type (figura R7).

La morfometría puso de manifiesto que el mayor porcentaje de células positivas a LH se acompañó de un aumento en el área celular mayor a expensas de un mayor tamaño en el núcleo y el citoplasma (figura R8), estadísticamente significativos ($p < 0.01$).

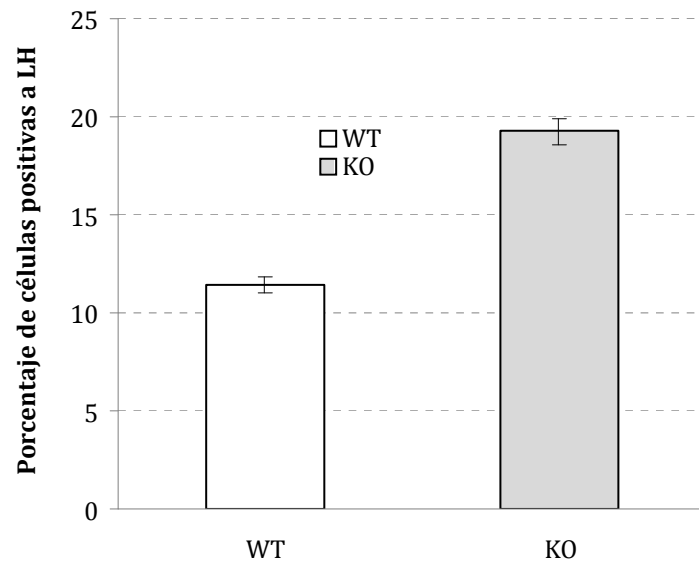


Figura R7. Gráfica que muestra las diferencias observadas en el porcentaje de células positivas a LH en el total de la hipófisis de los animales hembras estudiados.

WT: wild type; KO: knock out.

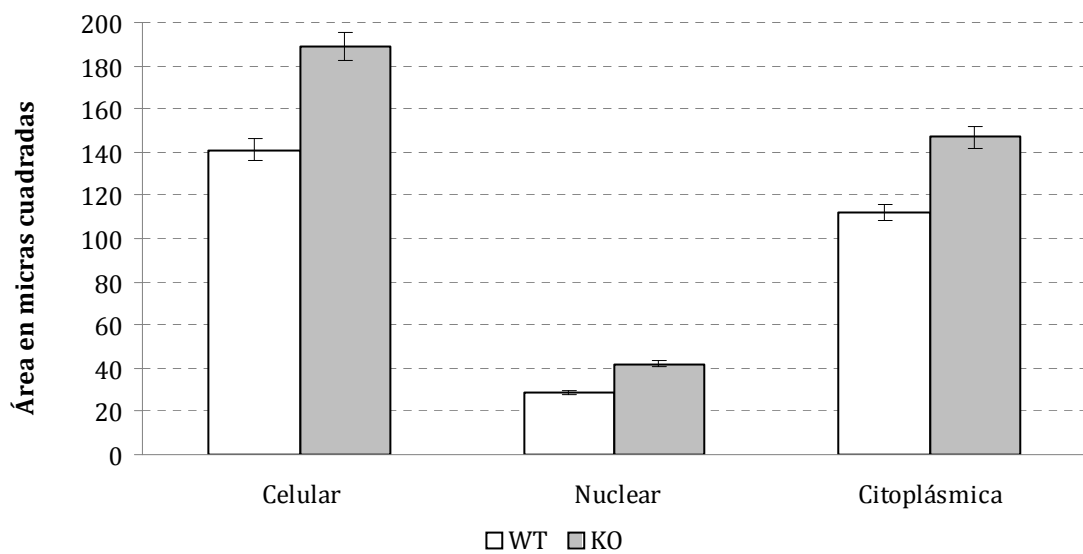
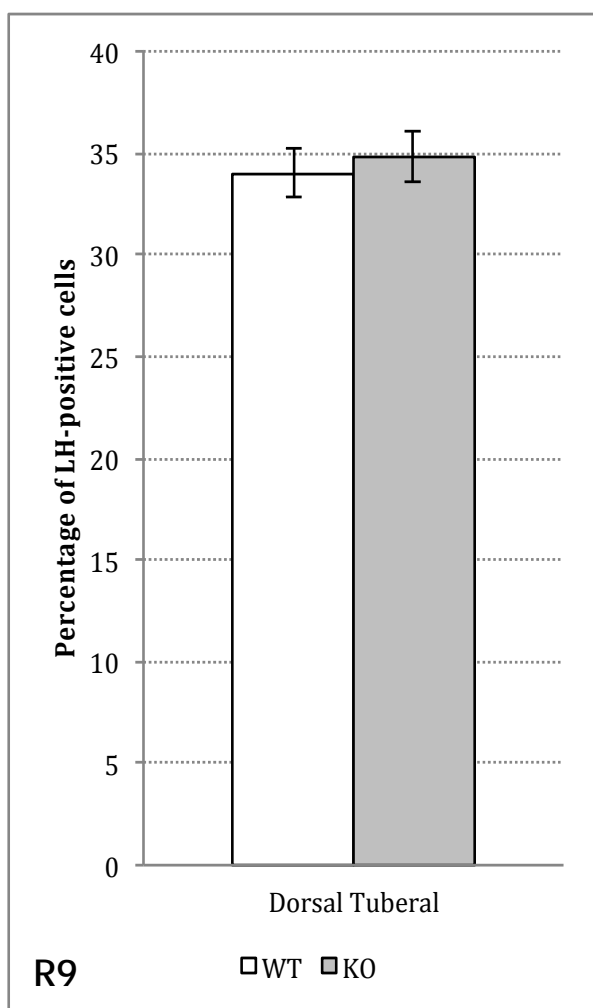


Figura R8. Gráfica que muestra las diferencias observadas en las áreas celular, nuclear y citoplásmica de células positivas a LH en el total de la hipófisis de los animales hembras estudiados.

WT: wild type; KO: knock out.

Región Dorsal Tuberal (1).



Como muestra la gráfica R9, las células positivas a LH en la región dorsal tuberal de la hipófisis, en los ratones hembra, son muy numerosas, con porcentajes en torno al 35% de la población celular total de esa región.

La densidad numérica en esta región fue muy similar en las hembras wild type con respecto a las knock out, que si bien presentaron un porcentaje algo superior las diferencias no fueron significativas en ningún momento.

Como se aprecia en las figuras R10 y R11, las células positivas a LH de esta región, en las hembras wild type formaron pequeños islotes o aglomerados, muy próximos a vasos sanguíneos.

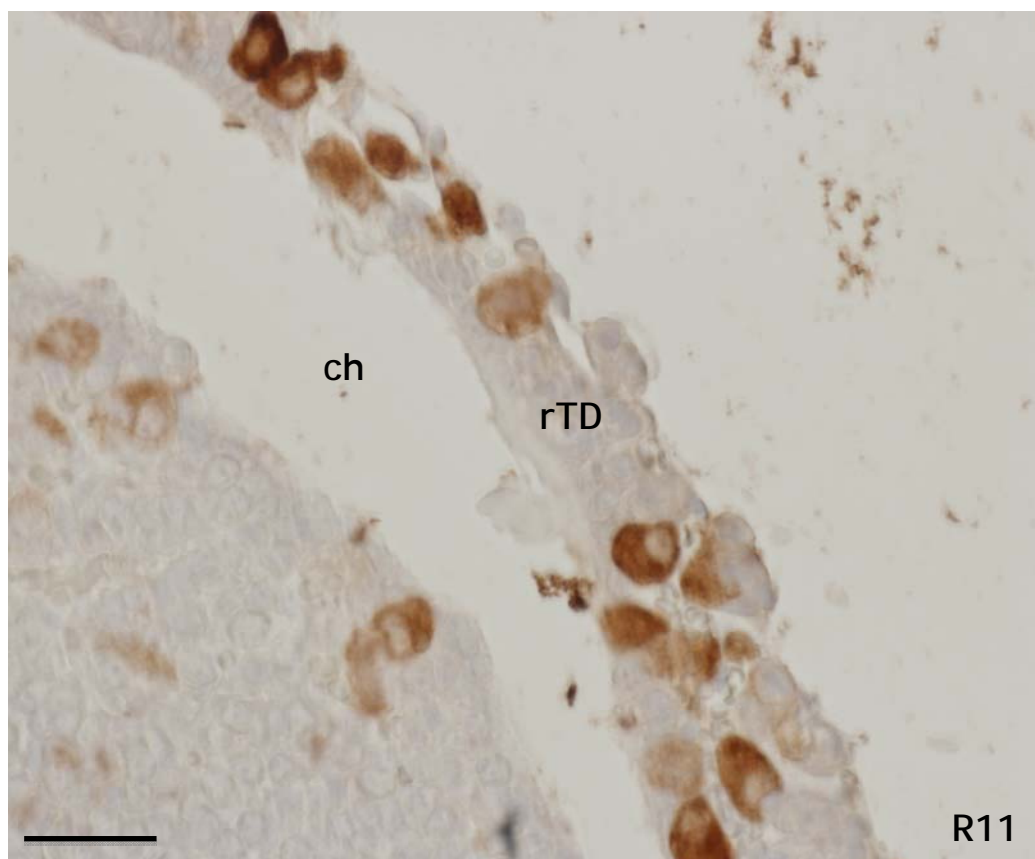
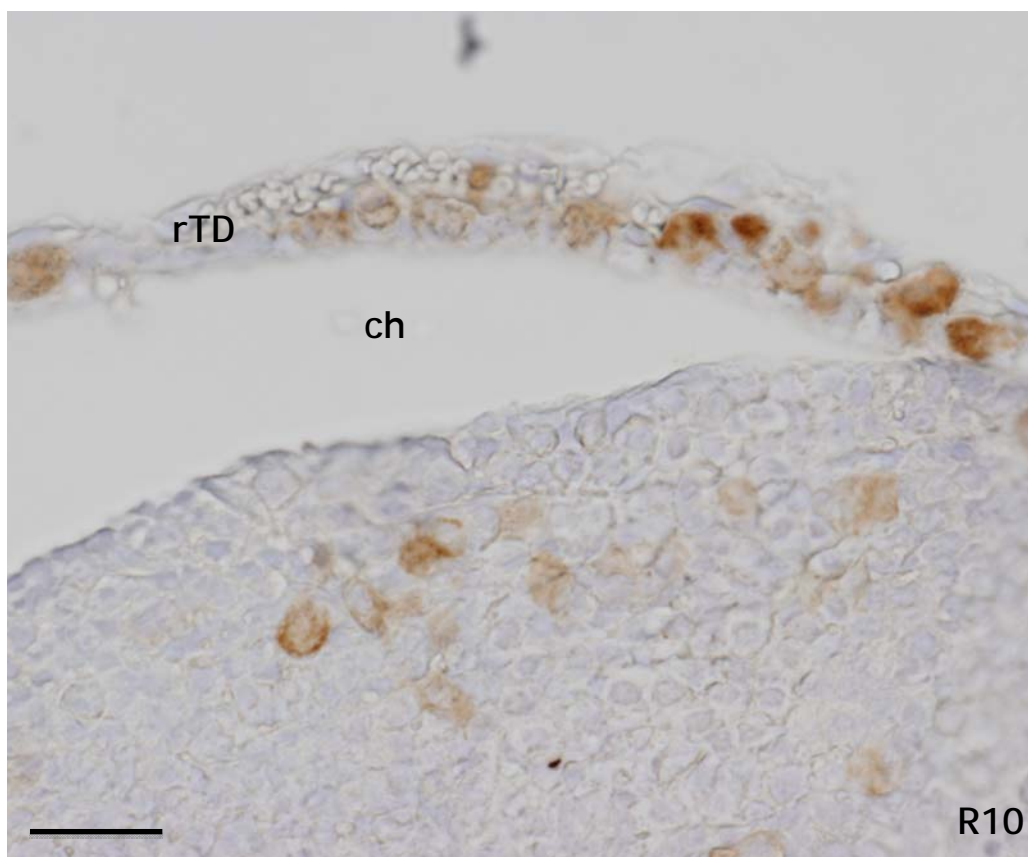
No obstante, el aspecto general a pequeños aumentos semeja un cordón celular discretamente discontinuo.

Ya a pequeños aumentos puede observarse la existencia de células con diferentes intensidades de reacción inmunocitoquímica, de manera que junto a células cuyos perfiles son fáciles de delimitar porque su citoplasma apareció fuerte y homogéneamente reactivo y la imagen nuclear era evidente, aparecieron células con un citoplasma menos reactivo, con zonas no reactivas y núcleos menos evidentes.

Figura R10: Micrografía de la región Dorsal Tuberal mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50.

Figura R11: Micrografía de la región Dorsal Tuberal mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50.

ch: caverna hipofisaria. rTD: región Dorsal Tuberal.



Las figuras R12 y R13 muestran las células gonadotropas positivas a LH de la región dorsal tuberal en las hembras knock out.

A bajos aumentos se aprecian claramente dos diferencias con respecto a lo observado en las hembras wild type.

La diferencia más llamativa es un claro aumento en la intensidad de la reacción inmunocitoquímica del citoplasma celular.

La segunda diferencia, algo menos notoria es que los grupos celulares son más compactos y están más próximos entre sí.

El resultado global de estas dos diferencias hace que el aspecto general de la región dorsal tuberal en las hembras knock out sea de mayor positividad, como si hubiera muchas más células; aunque la cuantificación planimétrica demuestra que no hay grandes diferencias en el porcentaje de células positivas.

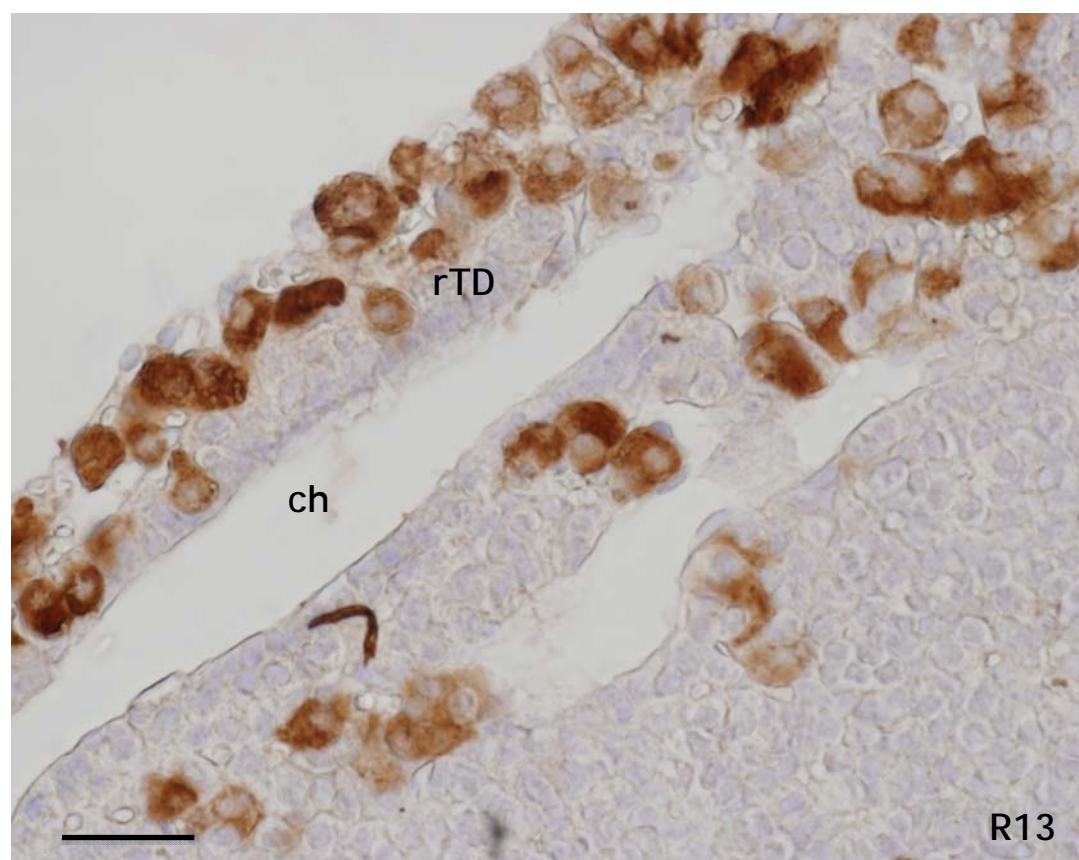
Este hallazgo, como puede evidenciarse en las imágenes es debido también a que la región dorsal tuberal en las hembras knock out es algo mayor que en las wild type y el número de células negativas a LH es mayor en las hembras knock out, lo que mantiene los porcentajes celulares en valores muy parecidos.

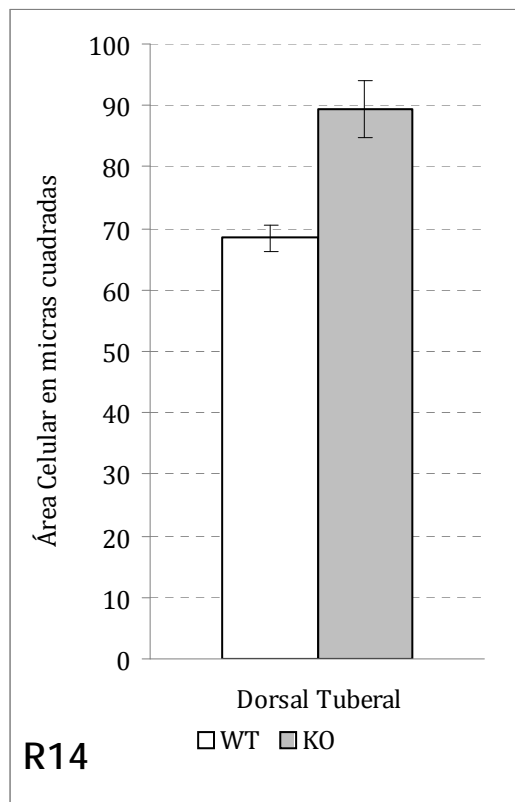
No obstante, el aspecto general cordonal y la proximidad a los vasos sanguíneos descrita para las hembras wild type, también es evidente en las knock out.

Figura R12: Micrografía de la región Dorsal Tuberal mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50.

Figura R13: Micrografía de la región Dorsal Tuberal mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50.

ch: caverna hipofisaria. rTD: región Dorsal Tuberal.

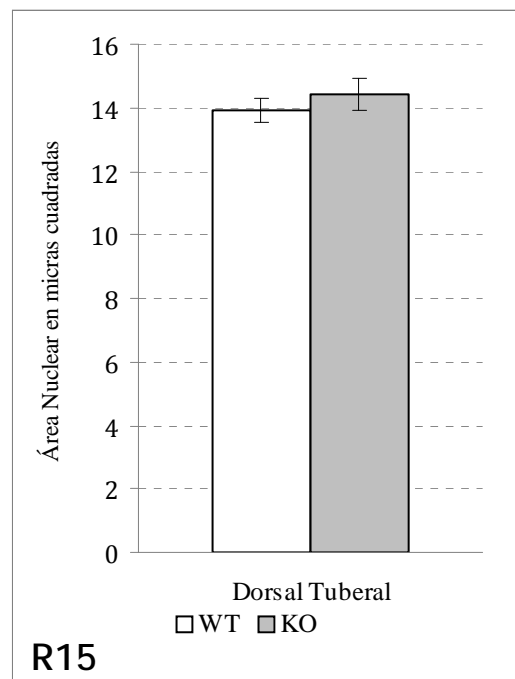




A diferencia de lo que ocurría al analizar los porcentajes de células positivas de esta región y comparar los resultados obtenidos entre las hembras wild type y las knock out, el estudio morfométrico reveló importantes y significativas diferencias entre los dos grupos.

Como muestran las gráficas R14 y R15, el área celular de las células positivas a LH de las hembras knock out fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que la que presentaron las hembras wild type (figura 14).

Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas al analizar las áreas nucleares (figura R15).



Las figuras R16 y R17 muestran a grandes aumentos las características de las células positivas a LH en las hembras wild type.

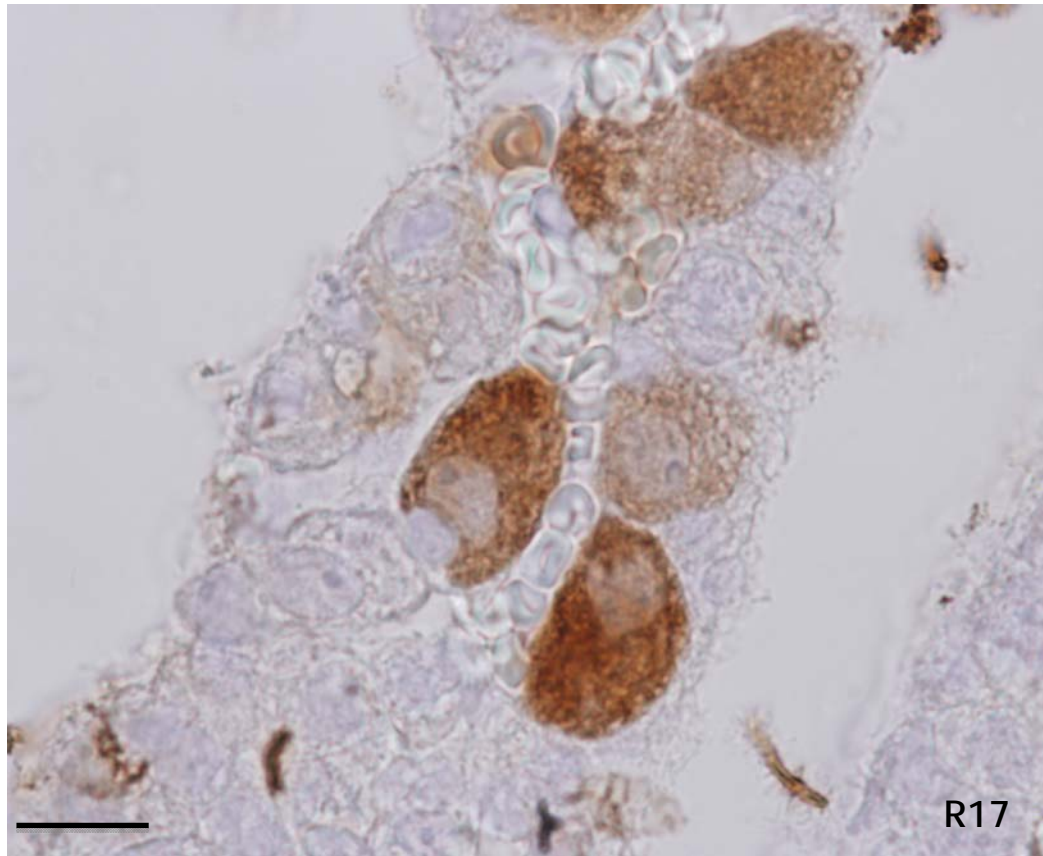
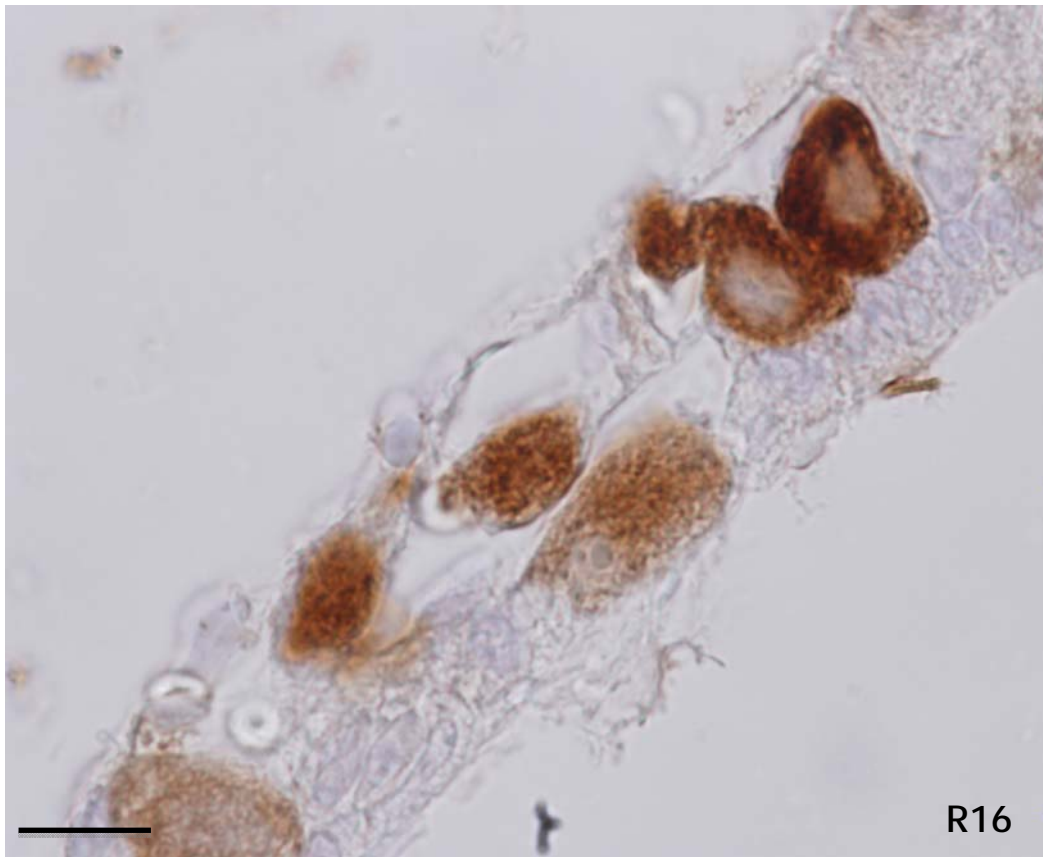
Se puede apreciar claramente que hay dos patrones de reacción de acuerdo a su intensidad. Sin embargo, en ambos casos, el depósito de cromógeno fue granular fino.

Las células fueron predominantemente ovaladas con núcleos débilmente teñidos a la hematoxilina, en muchas ocasiones con nucleolos evidentes, y generalmente polarizados hacia un polo celular.

La vecindad de las células positivas a los vasos sanguíneos fue clara y manifiesta.

Figura R16: Micrografía de la región Dorsal Tuberal mostrando las células positivas a LH (flechas) en una hembra wild type. Barra x25.

Figura R17: Micrografía de la región Dorsal Tuberal mostrando las células positivas a LH (flechas) en una hembra wild type. Barra x25.



En las hembras knock out, como se observa en las figuras R18 y R19, las células positivas a LH a grandes aumentos muestran características morfológicas claramente distintas a las observadas en las hembras wild type.

En muchas ocasiones, las células aparecieron muy intensamente reactivas, como se muestra en la figura R18 (flecha), dificultando incluso la visualización nítida del núcleo celular.

Los citoplasmas aparecieron intensamente reactivos, pero a diferencia de lo que se observó en las hembras wild type, la distribución de la reacción por el citoplasma no fue homogénea.

El patrón granular de depósito del cromógeno se pierde en casi todas las células por tres hallazgos principales:

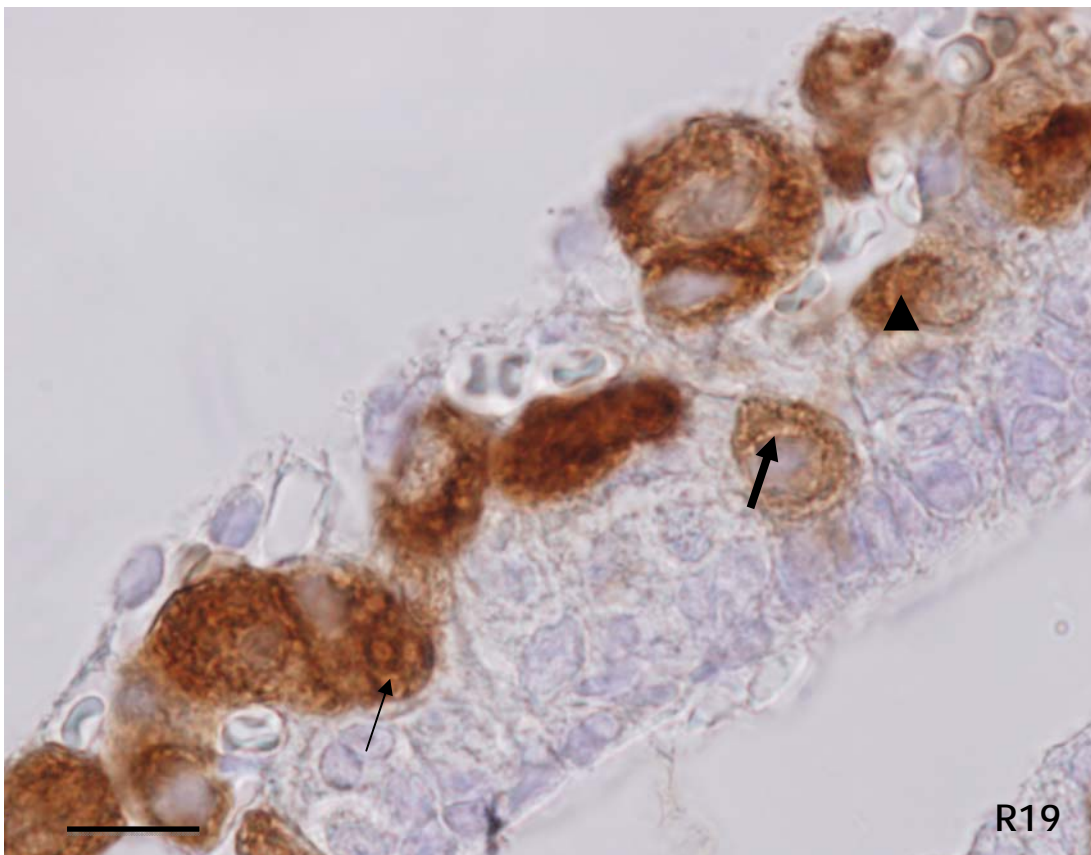
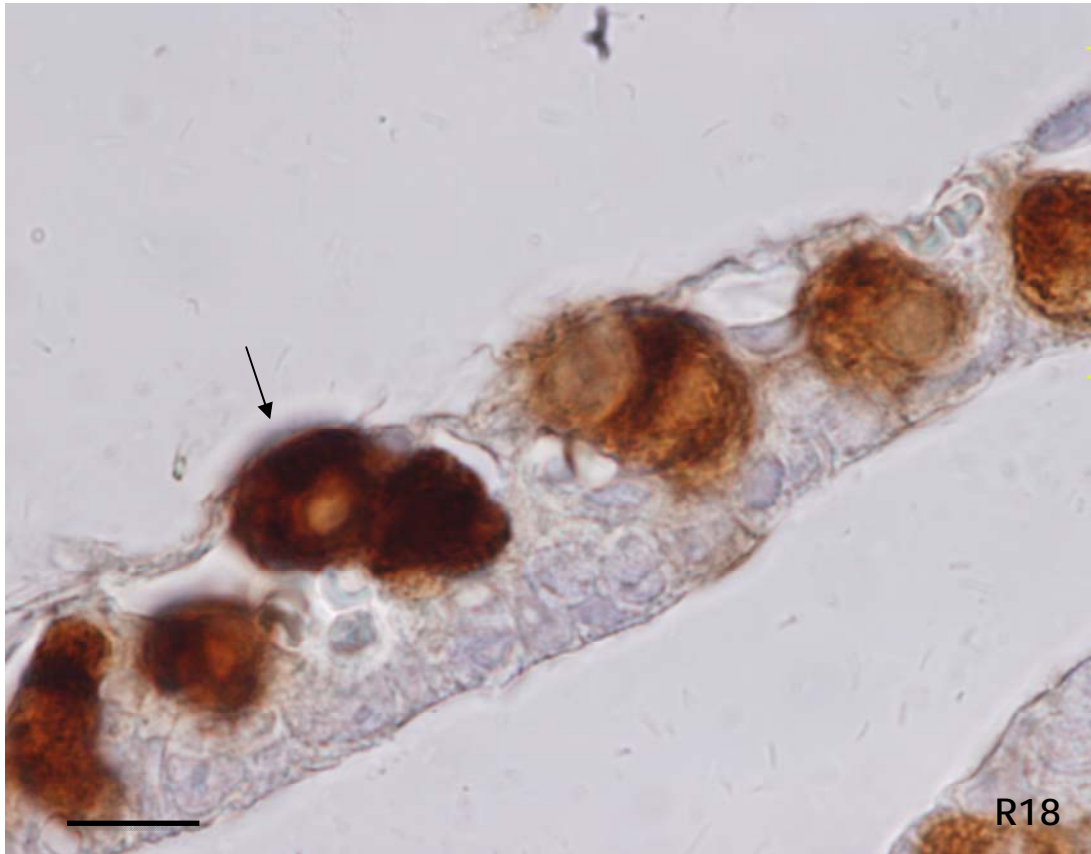
En primer lugar, en las células intensamente reactivas, el depósito es de aspecto grumoso y compacto.

En segundo lugar, aparecen imágenes cisternales, de retículo endoplásmico rugoso, con bordes intensamente reactivos y una zona central menos reactiva (flecha fina en figura R19).

En tercer lugar, la sombra negativa del aparato de Golgi es más evidente en estos animales, adoptando dos patrones: formando un anillo en torno al núcleo (flecha gruesa en figura R19) o bien delimitando un espacio paranuclear con dictiosomas claros periféricos y una zona central más reactiva de aspecto granular (cabeza de flecha en figura R19).

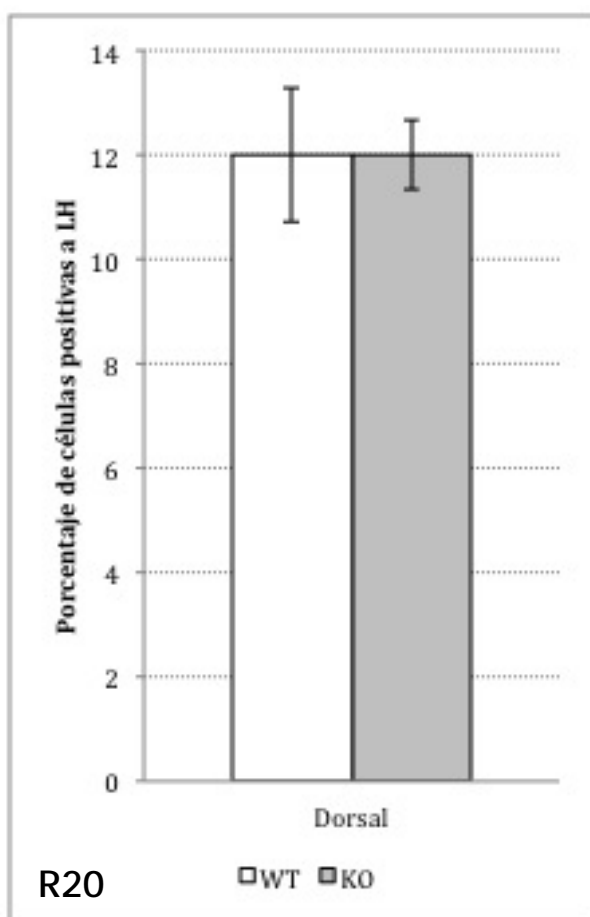
Figura R18: Micrografía de la región Tuberal-Dorsal mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25.

Figura R19: Micrografía de la región Tuberal-Dorsal mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25.



Región dorsal (6).

Al analizar la población de células gonadotropas en la región dorsal de la hipófisis de las hembras wild type, se apreció que aproximadamente el 12% de las células de esta región eran células positivas a LH (figura R20). Un porcentaje claramente inferior al observado en la región dorsal tuberal ($p < 0.01$).



En las hembras knock out, el porcentaje de células positivas a LH también fue menor en la región dorsal que en la dorsal tuberal ($p < 0.05$).

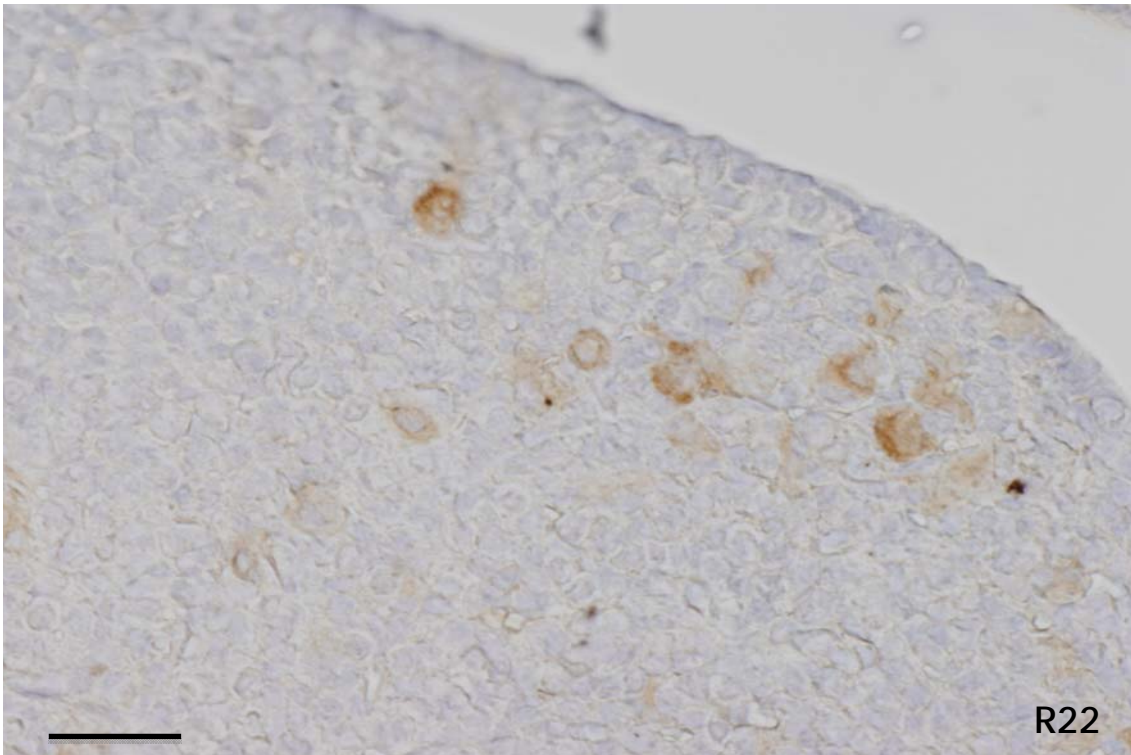
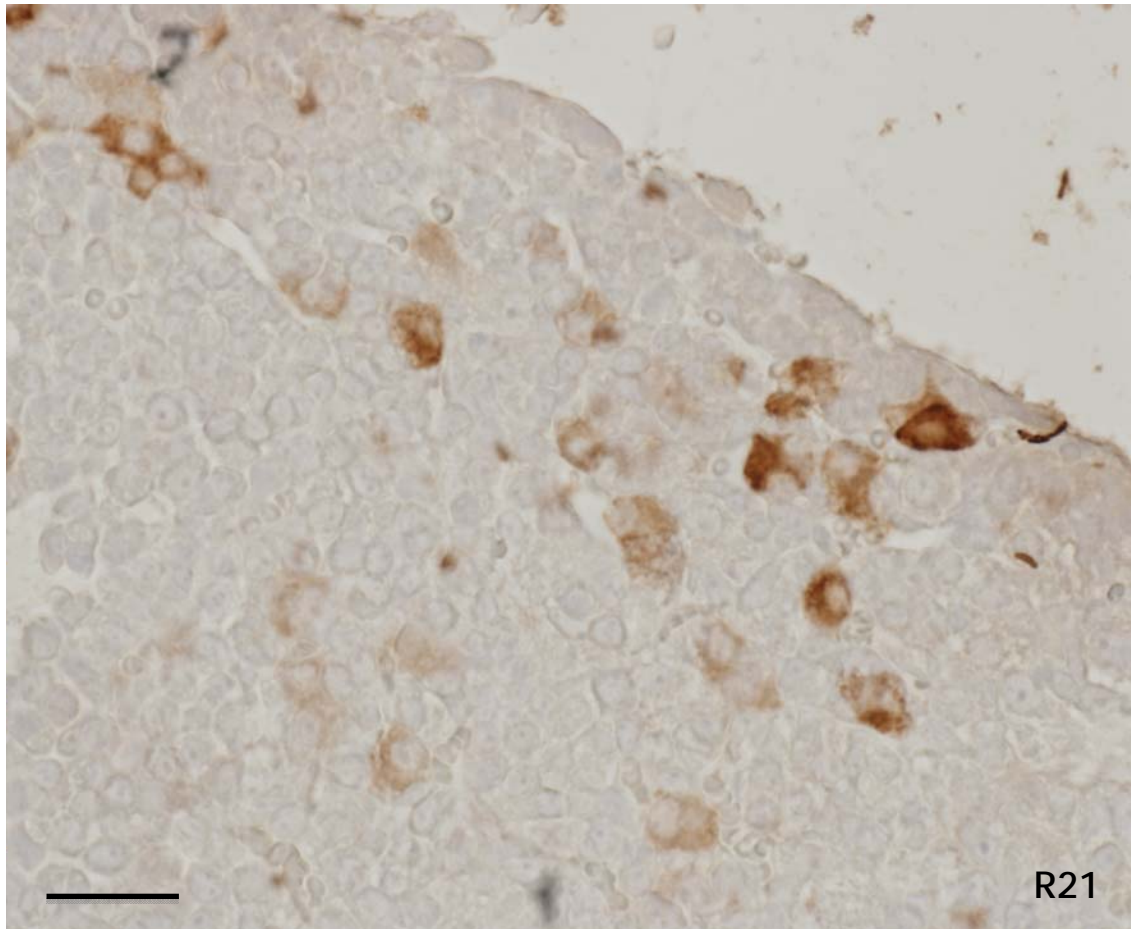
Al comparar la región dorsal de las hembras knock out con la de las hembras wild type (figura R20), no se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje celular de esta región.

En la región dorsal de las hembras wild type, las células positivas a LH fueron mayoritariamente células débilmente reactivas. En general, aparecían dispersas entre células no reactivas y sin formar islotes o cordones evidentes (figuras R21 y R22).

En estos animales, los márgenes más periféricos de la región dorsal apenas presentaron células positivas a LH.

Figura R21: Micrografía de la región Dorsal mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50.

Figura R22: Micrografía de la región Dorsal mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50.



La disposición de las células positivas a LH en la región dorsal de la hipófisis de las hembras knock out fue muy diferente a la observada en las hembras wild type.

Al margen de que a simple vista se evidenció que el número de células era mayor, como ya hemos descrito en el estudio planimétrico, la intensidad de la reacción, la colocación de las células dentro de la región y la disposición entre ellas también fueron distintas.

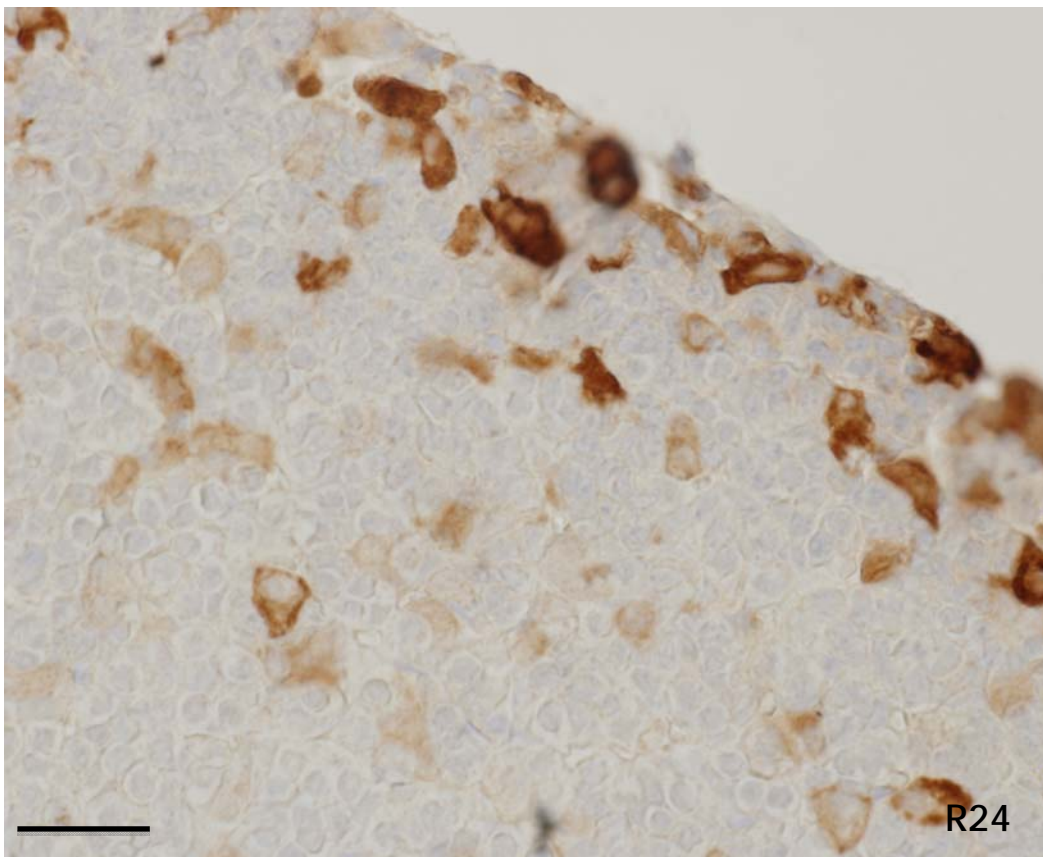
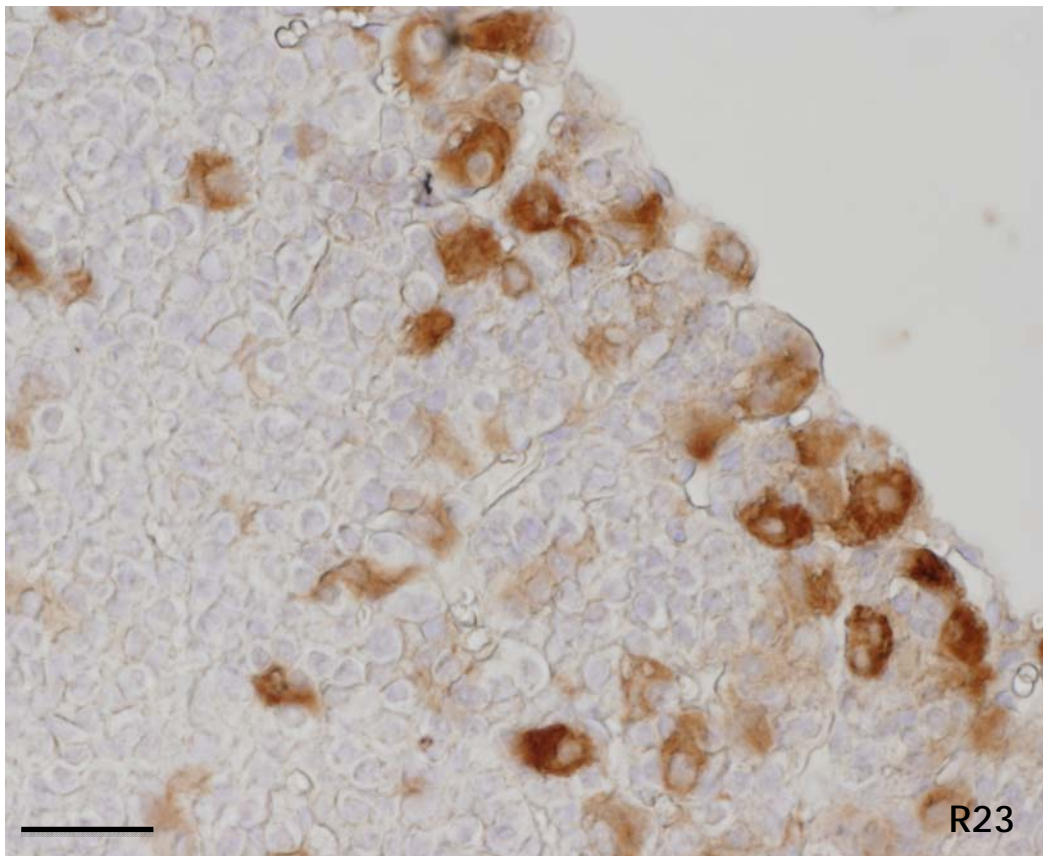
Junto a células débilmente reactivas, semejantes a las observadas en las hembras wild type, las knock out presentaron células intensamente reactivas.

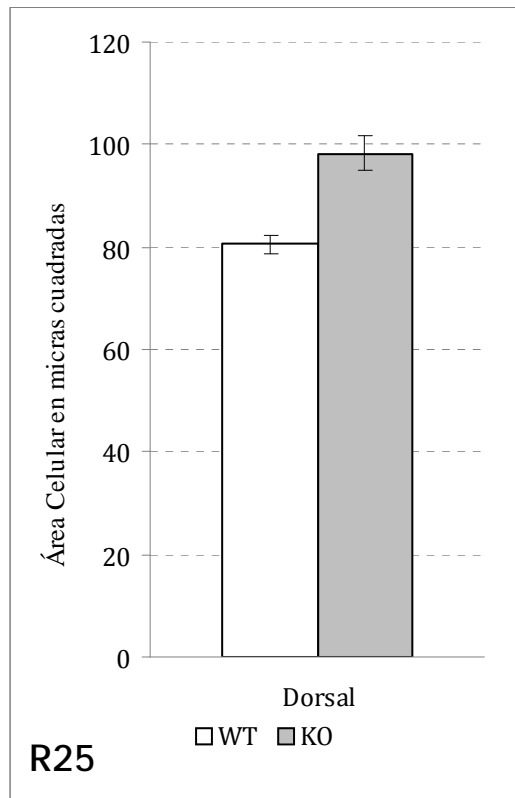
La presencia de células en los márgenes periféricos de la región fue muy evidente en estos animales, hasta el extremo de que las células positivas eran más numerosas en los márgenes que en la zona interna.

Desde los márgenes hacia la zona interna o en la propia zona interna aparecieron cordones discontinuos de células positivas vecinas o siguiendo el trayecto de vasos sanguíneos.

Figura R23: Micrografía de la región Dorsal mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50.

Figura R24: Micrografía de la región Dorsal mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50.

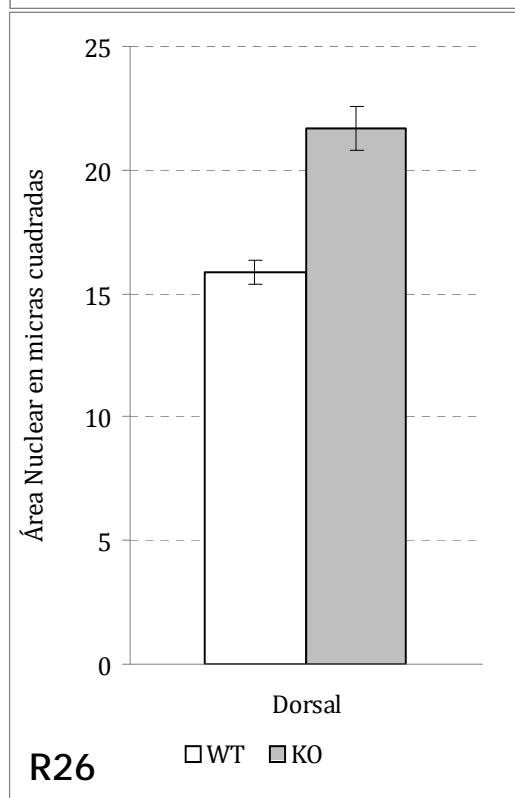




Las células positivas a LH de la región dorsal de la hipófisis fueron significativamente menores ($p < 0.01$) en las hembras wild type que en las hembras knock out (figura R25).

Este aumento de tamaño afectó de forma semejante a toda la célula, siendo claro y evidente ($p < 0.01$) al considerar el área nuclear (figura R26).

La reactividad de las células positivas a LH en la región dorsal de las hembras wild type fue variable de unos animales a otros y de una parte a otra de la glándula. Las figuras R27 y R28 muestran esta variabilidad.

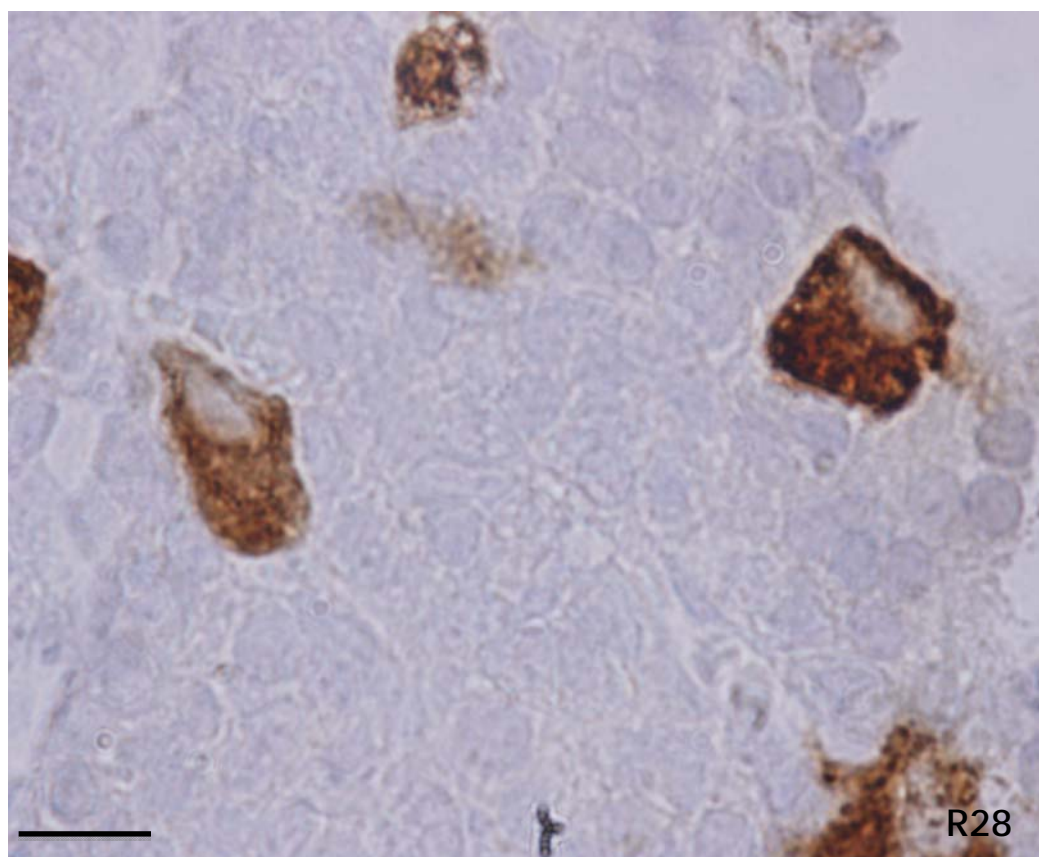
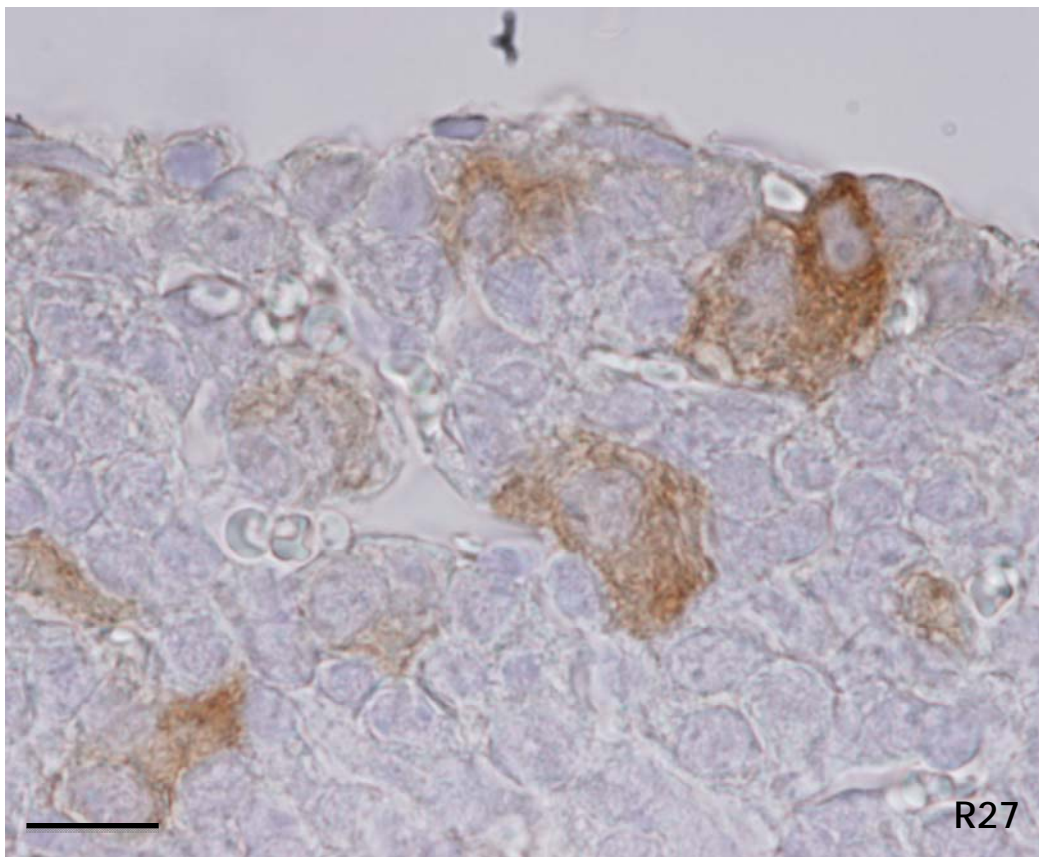


En estos animales las células positivas a LH de la región dorsal presentaban formas irregulares o poligonales. Con un núcleo ovalado, casi siempre desplazado hacia un lado o polo celular.

Los citoplasmas presentaron una reacción uniforme, intensa o débil, pero afectando a toda la superficie del citoplasma por igual.

Figura R27: Micrografía de la región Dorsal mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25

Figura R28: Micrografía de la región Dorsal mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25



En las hembras knock out, las células positivas a LH de la región dorsal también presentaron forma irregular, aunque en estos animales eran más ovaladas que poligonales.

Los núcleos eran redondeados o irregulares y, como en las hembras wild type, a veces, con nucleolo evidente, aunque fue más frecuente que esta organela no se apreciara.

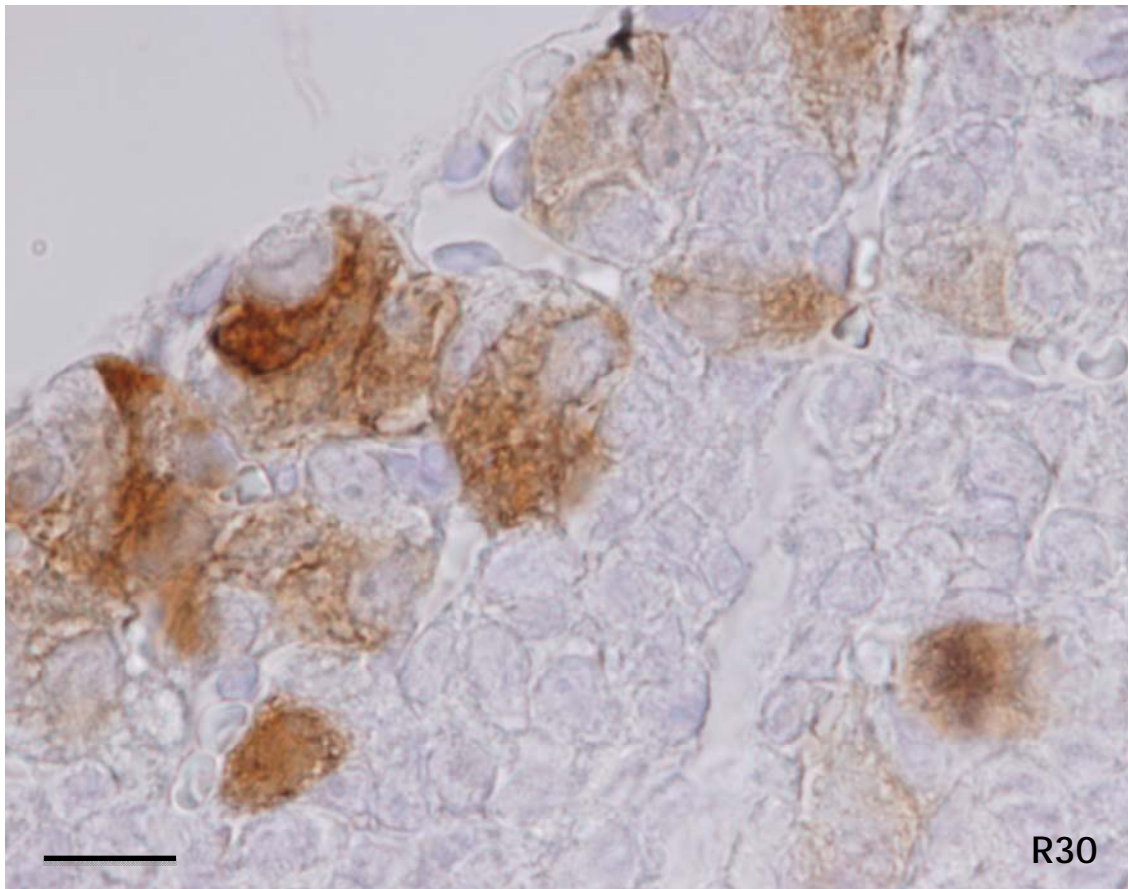
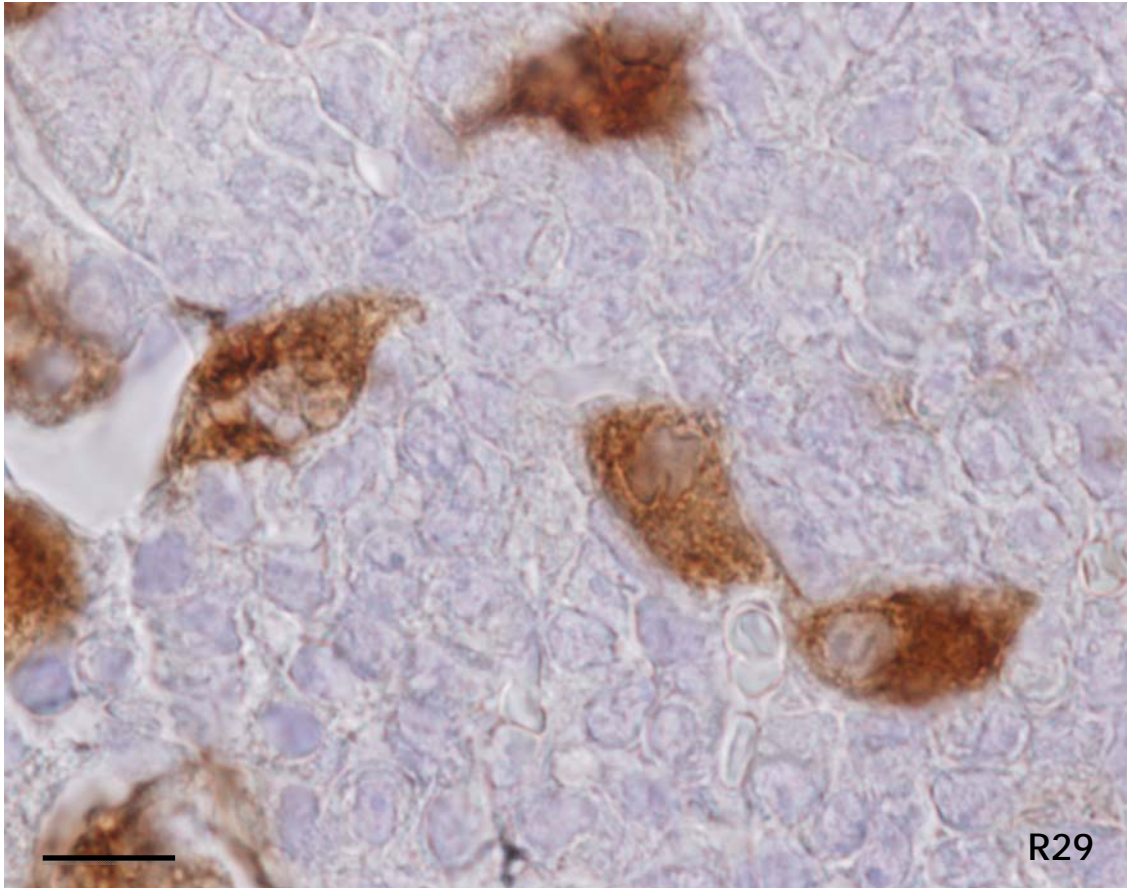
También presentaron diferencias en la intensidad de reacción, pero mucho menos llamativas que las que se observaban en las hembras wild type.

A diferencia de ellas, en estos animales fue frecuente observar células con espacios lacunares sin reacción dentro del citoplasma, lo que hizo que la reacción no fuera homogénea.

Las cisternas de retículo endoplásmico rugoso o las imágenes negativas del aparato de Golgi, pudieron apreciarse en algunas células, aunque estos hallazgos fueron menos llamativos y frecuentes que en la región dorsal-tuberal.

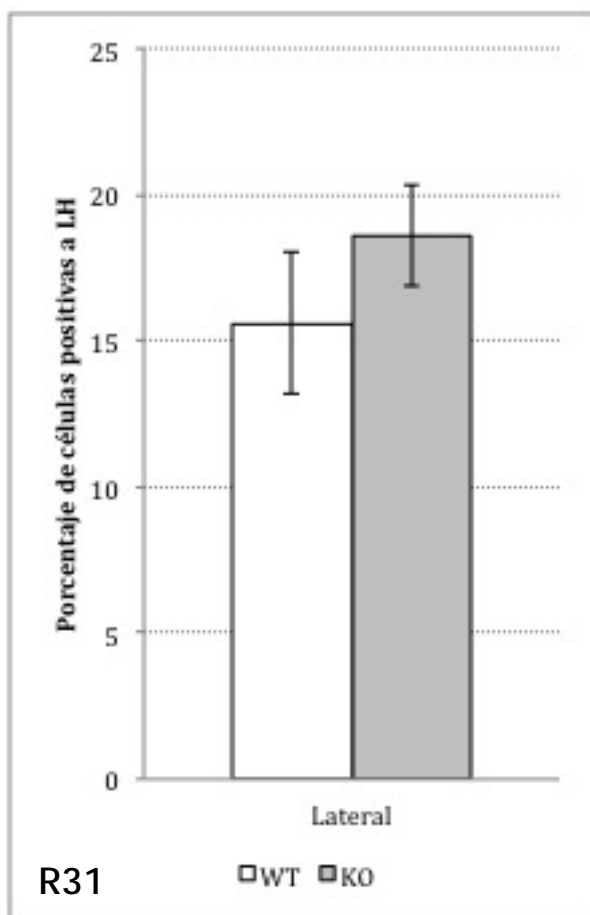
Figura R29: Micrografía de la región Dorsal mostrando las células positivas a LH (flechas) en una hembra knock out. Barra x25

Figura R30: Micrografía de la región Dorsal mostrando las células positivas a LH (flechas) en una hembra knock out. Barra x25



Región lateral (5).

Las células positivas a LH en la región lateral de la hipófisis de las hembras, wild type o knock out, se distribuyen de forma no homogénea, dejando espacios amplios de esta región sin que haya células positivas.



Debido a ello, aunque el porcentaje de células positivas fue mayor en las hembras knock out que en las wild type (figura R31), las diferencias observadas no fueron significativas por el gran valor de la varianza y del error estándar de la media.

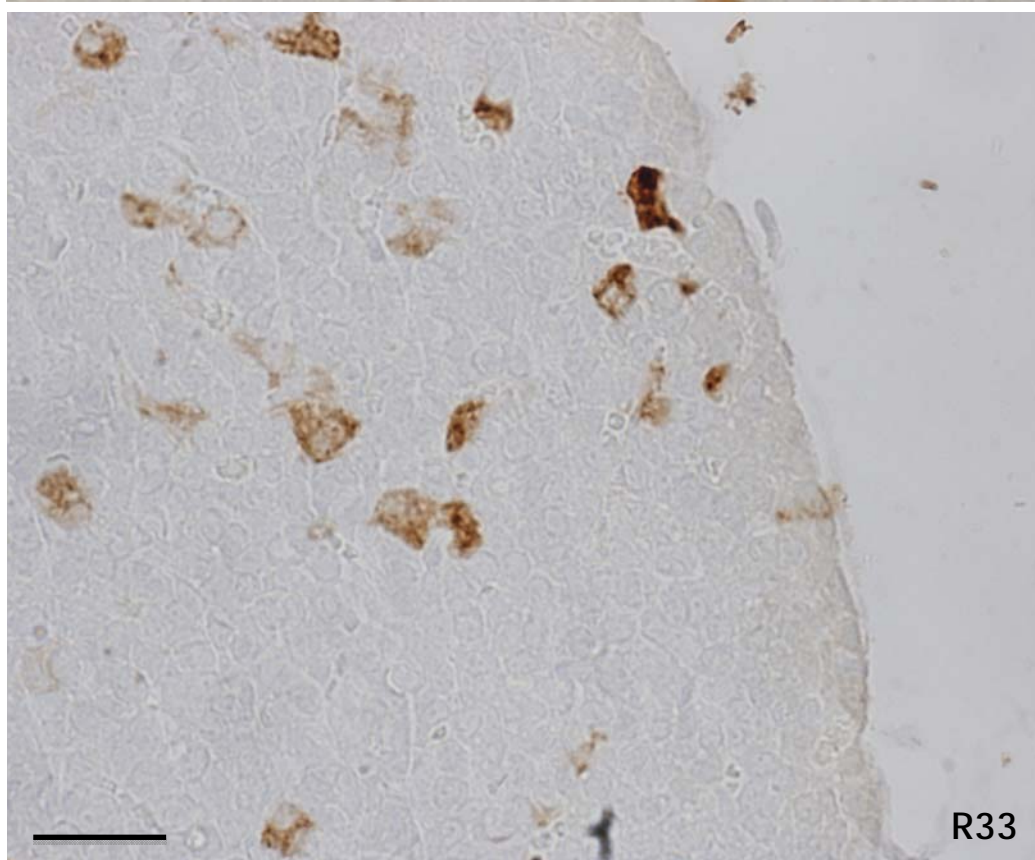
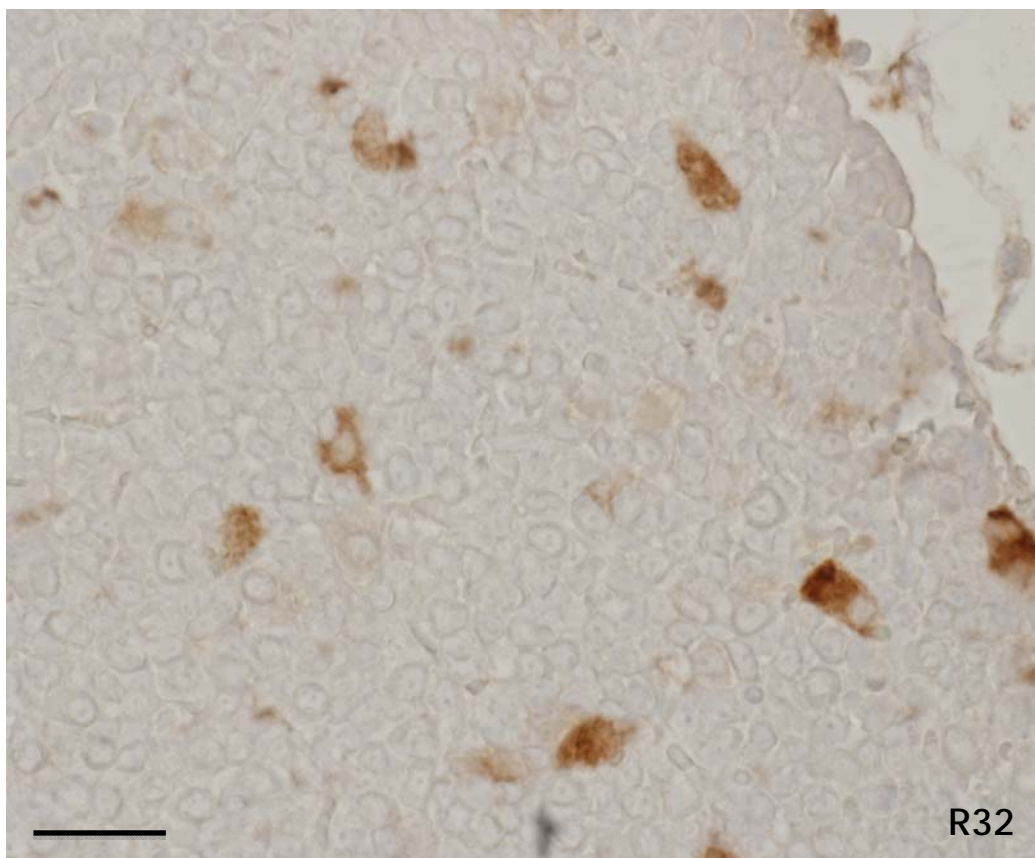
Las figuras R32 y R33 se tomaron de la región lateral de dos hembras wild type.

En ellas se hace evidente la distribución deslabazada de las células positivas a LH que aparecieron muy separadas unas de otras y dejando grandes áreas sin células positivas.

En estos animales se apreció la característica típica de estas células de presentar dos patrones de marcaje, en lo que respecta a su intensidad de reacción inmunocitoquímica, células muy reactivas y células poco reactivas.

Figura R32: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50

Figura R33: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50



La región lateral de la hipófisis de las hembras knock out presentó unas células positivas a LH con características similares a las observadas en las hembras wild type (figuras R34 y R35).

Como ya hemos comentado al describir los resultados planimétricos, las células positivas fueron más abundantes, pero distribuidas de forma no uniforme por la región lateral, dejaron amplias zonas en las que todas las células fueron negativas.

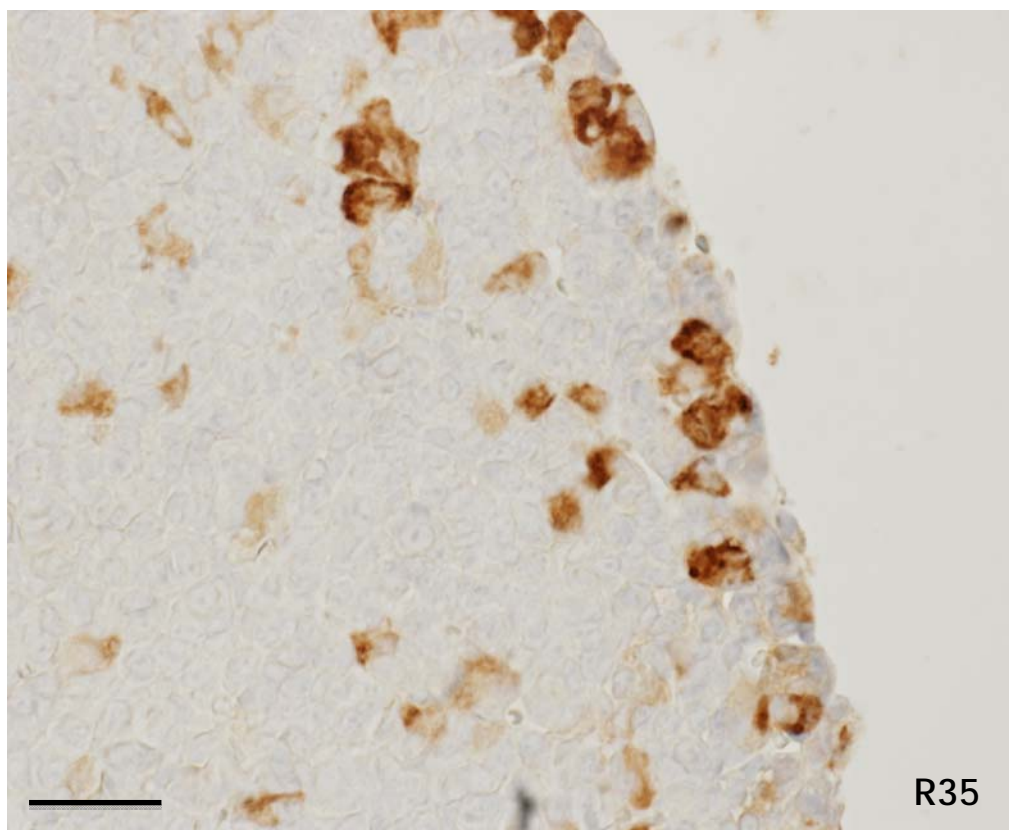
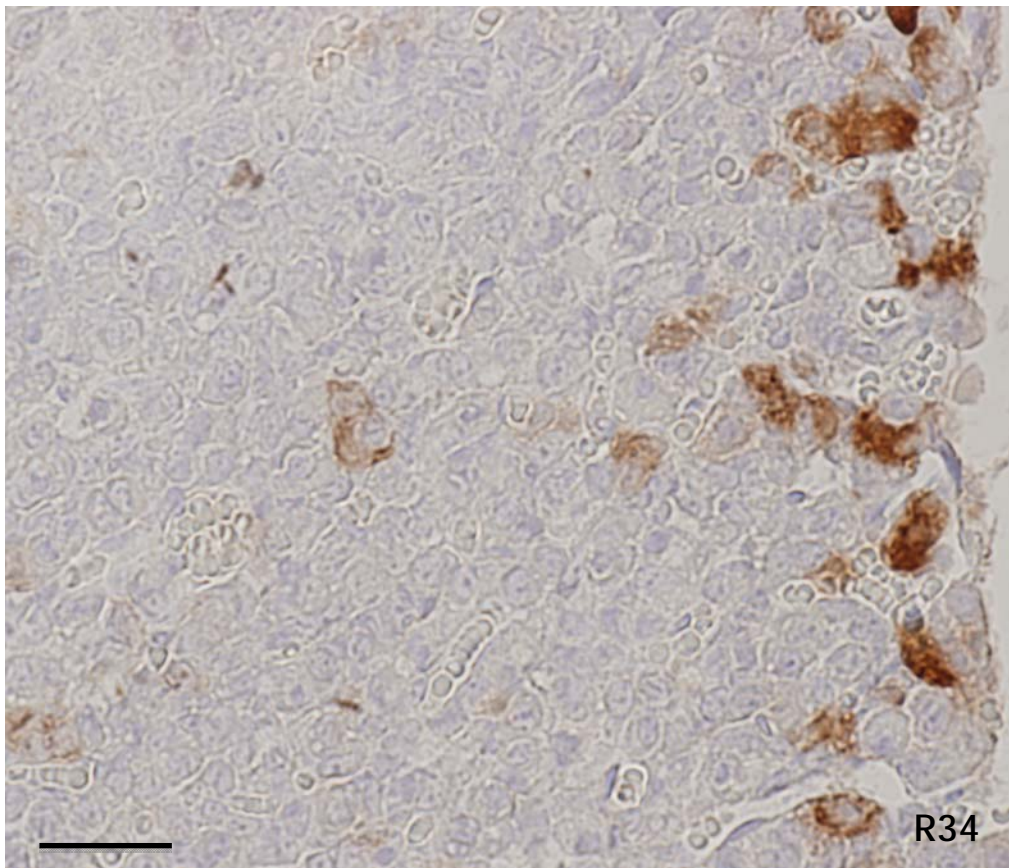
No obstante, la disposición de las células positivas en estos animales presentó dos diferencias fácilmente observables a pequeños aumentos:

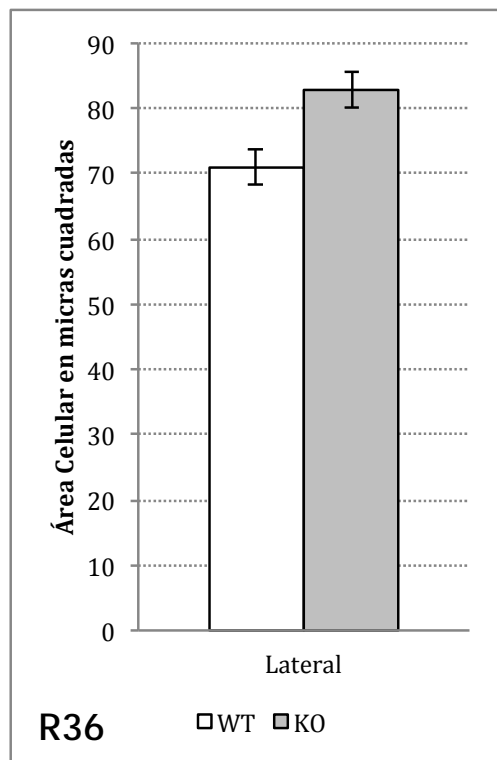
En primer lugar, las células positivas fueron más abundantes en los márgenes de la región, justo en los bordes laterales de la glándula.

En segundo lugar, las células no aparecieron tan aisladas como en los wild type, de manera que era frecuente observar pequeños islotes de 3 a 4 células positivas contactando entre sí.

Figura R34: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

Figura R35: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

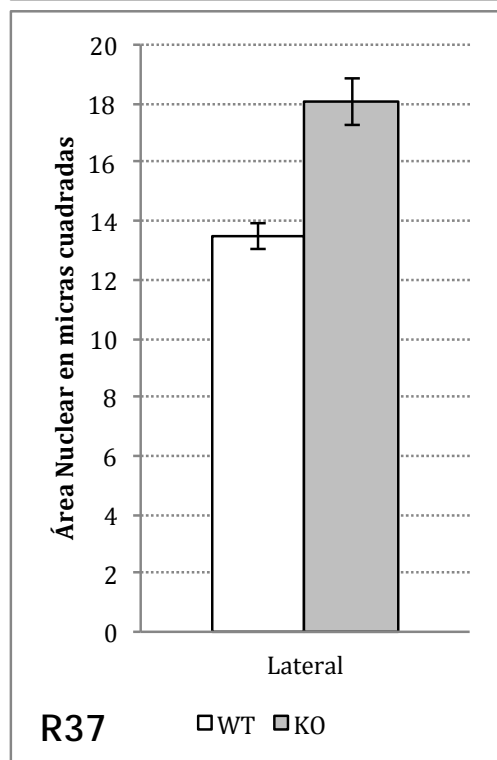




Las células positivas a LH de la región lateral de la hipófisis de las hembras wild type fueron significativamente ($p < 0.05$) más pequeñas que las de las hembras knock out (figura R36).

Esas diferencias de tamaño en el área celular se observaron también al analizar el área nuclear (figura R37), de manera que en las hembras knock out el área nuclear fue significativamente mayor que en las wild type ($p < 0.05$).

Las figuras R38 y R39 son claros exponentes de cómo se organizan las células positivas a LH en las hembras wild type, así como de sus principales características morfológicas.



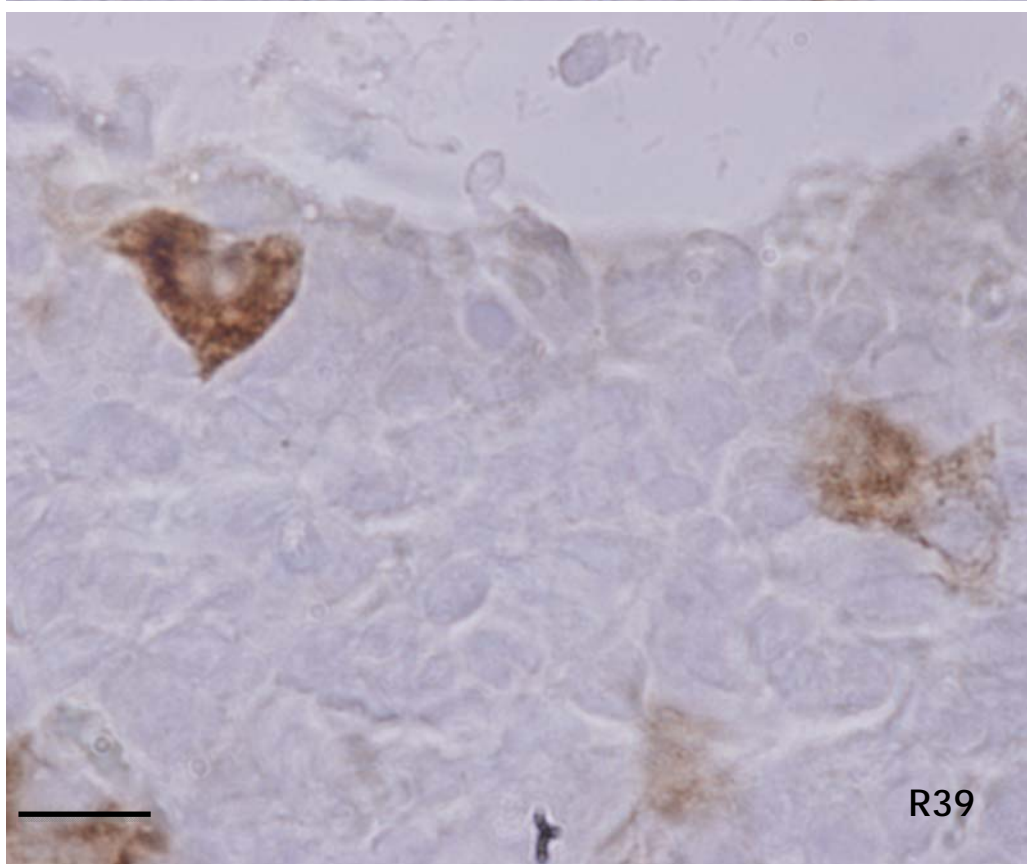
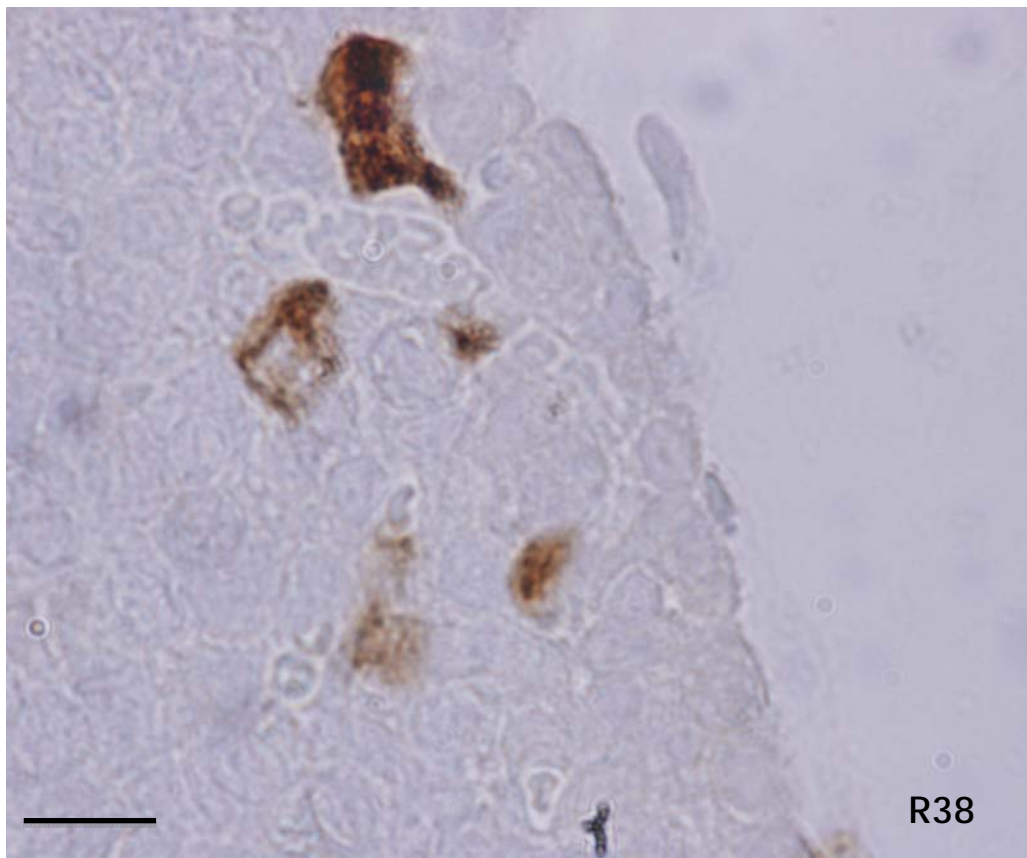
Células aisladas, raramente dispuestas en el margen periférico de la glándula, muy irregulares y sin patrones definidos en su forma. Con cortas prolongaciones citoplásmicas.

El citoplasma aparece irregularmente reactivo, en el que se aprecian zonas sin reacción que semejan lagunas de retículo endoplásmico rugoso, la imagen negativa del aparato de Golgi rara vez pudo observarse.

Los núcleos redondeados o poligonales, poco cromáticos y sin nucleolo, generalmente aparecieron desplazados.

Figura R38: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25

Figura R39: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25



Las figuras R40 y R41 muestran células positivas a LH de hembras knock out tomadas de las zonas en las que aparecen células reactivas dentro de la región lateral de la hipófisis. Junto a estas zonas con células positivas, como ya hemos descrito anteriormente, aparecen zonas en las que no hay células positivas.

En ambas imágenes puede apreciarse claramente que las células positivas aparecen formando pequeños islotes de 2 a 4 células.

La forma predominante es poligonal, pero en ocasiones las células presentan prolongaciones citoplásmicas que abrazan a células no reactivas (flecha en figura R40) lo que hace que su morfología sea irregular.

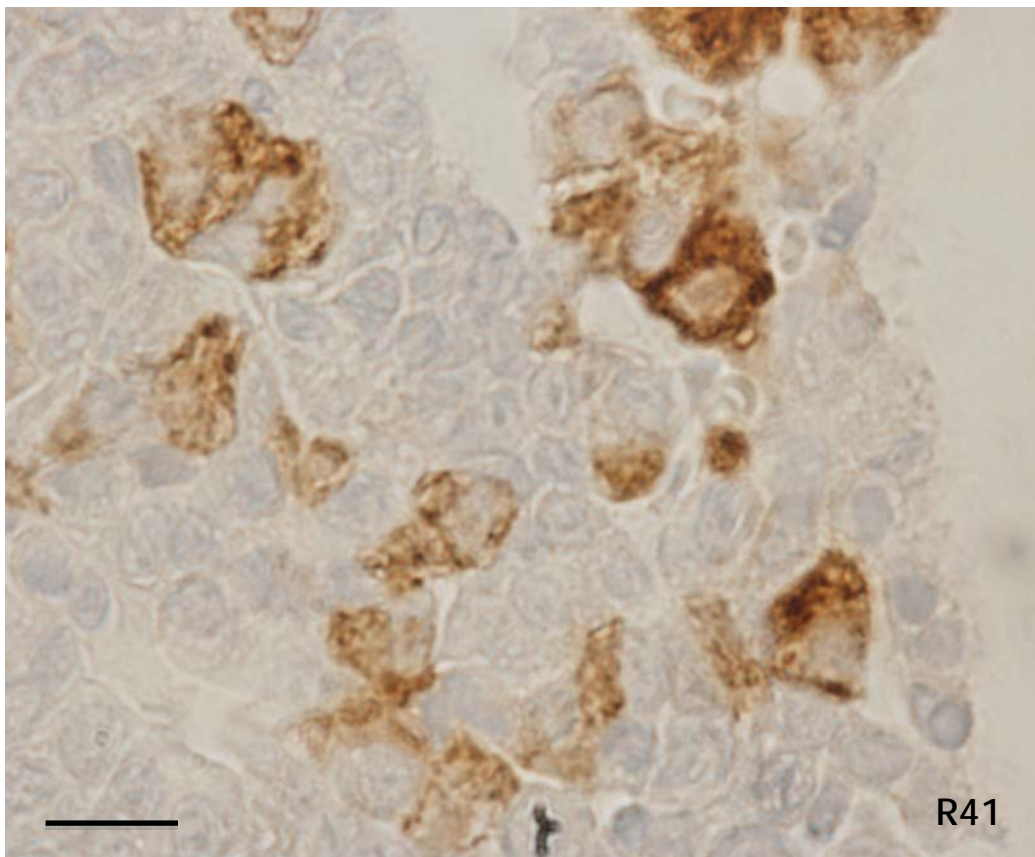
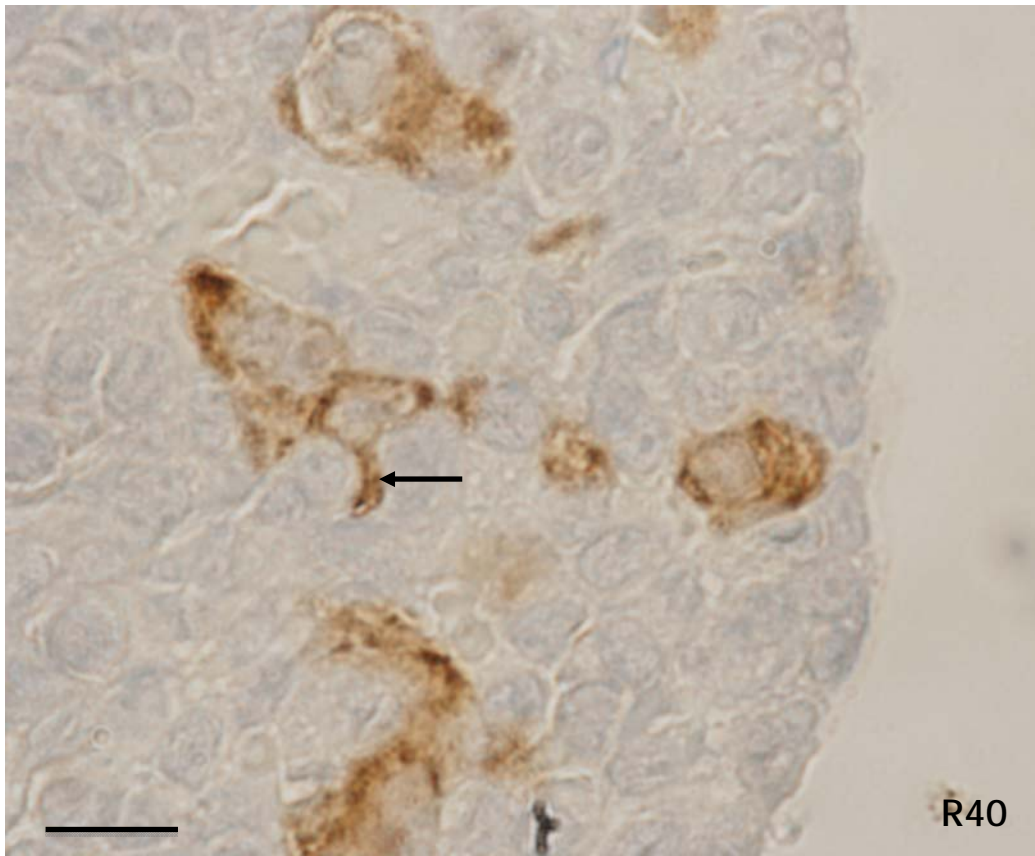
Aunque estos animales presentaron células positivas intensamente reactivas junto a otras menos reactivas, las diferencias fueron menos llamativas que en las hembras wild type, debido a que las células débilmente reactivas presentaron una reacción más intensa que en las wild type.

El aspecto de la reacción siempre fue granular y la distribución de la reacción inmunocitoquímica fue irregular en casi todas las células. Ello se debía a que era muy frecuente observar espacios lacunares de retículo endoplásmico rugoso e imágenes negativas del aparato de Golgi que casi siempre formaban un anillo perinuclear sin reacción.

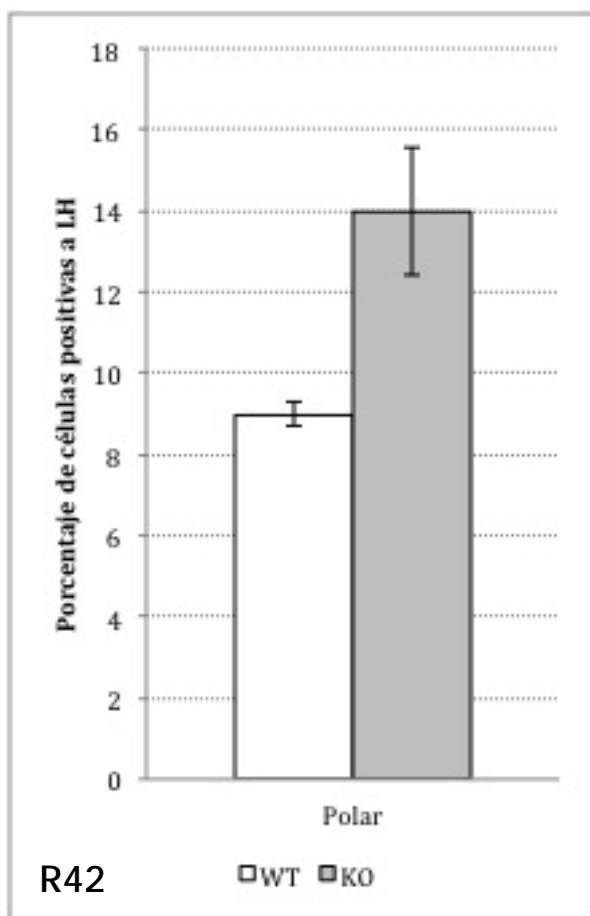
Los núcleos casi siempre fueron hipocromáticos, redondeados u ovalados, y a veces con nucleolo evidente.

Figura R40: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25

Figura R41: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25



Región Polar (4).



La región de la hipófisis que en nuestro estudio hemos llamado polar es una zona de transición entre la parte más ventral de la zona lateral y la parte más lateral de la zona ventral de la glándula.

Esta localización hace que las características, en lo que a las células positivas a LH se refiere, distribución, morfología, número, tamaño, etc. sea una combinación de las características que definen a las regiones lateral y ventral lateral de la glándula.

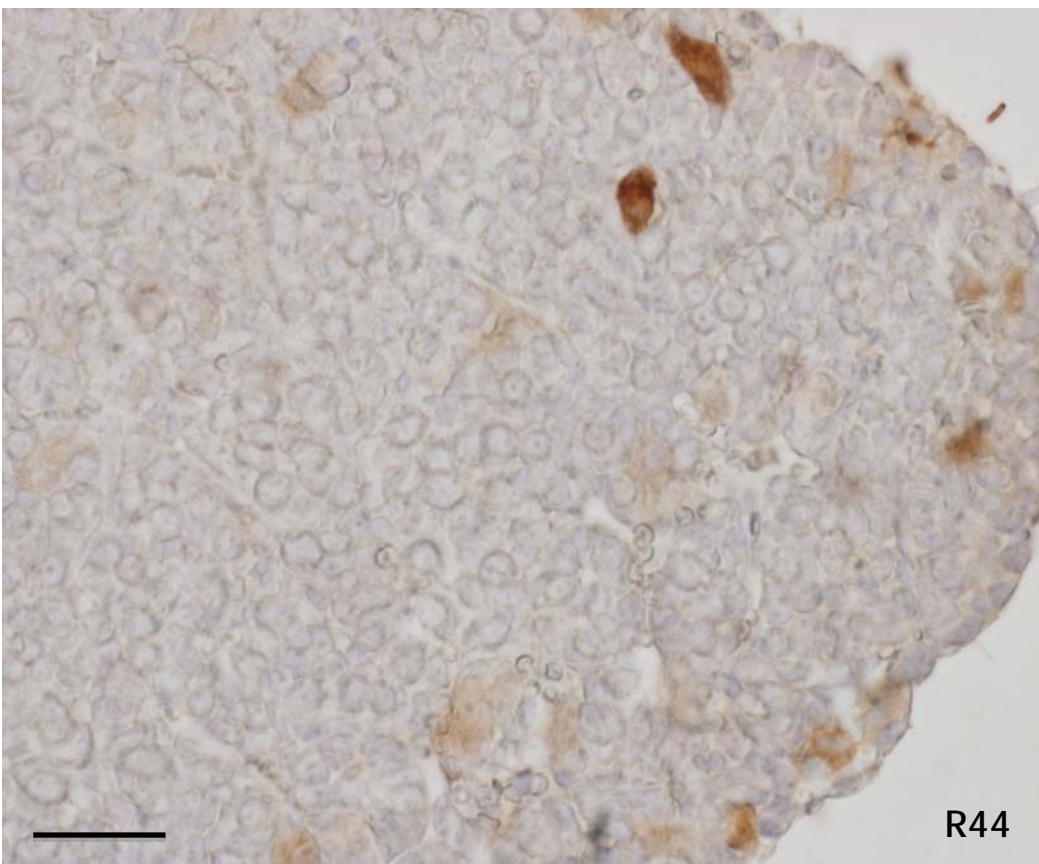
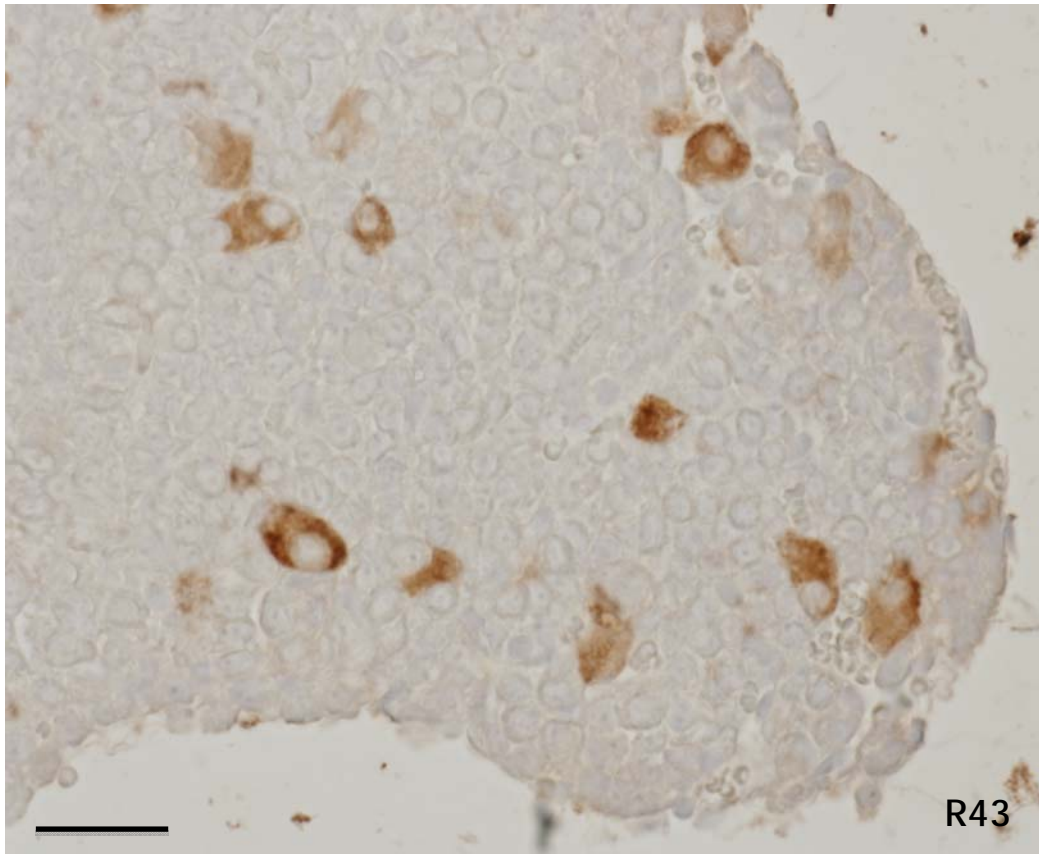
Como puede apreciarse en la gráfica de la figura R42 y en las micrografías a bajos aumentos de las figuras R43 a R46, el porcentaje de células positivas a LH en la región polar de la hipófisis de las hembras knock out fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que el observado en las hembras wild type.

En la hembras wild type, las células positivas a LH de la región polar, rara vez ocuparon los márgenes periféricos de la glándula y, de unos animales a otros se apreciaron diferencias que afectaron sobre todo a la intensidad de la reacción inmunocitoquímica. Las figuras R43 y R44 pertenecen a dos hembras distintas pero en ambas la inmunocitoquímica se desarrolló en la misma serie, estando sometidas las preparaciones a la misma alícuota de anticuerpo, con condiciones ambientales y temporales de incubación y revelado exactamente idénticas. Sin embargo, puede observarse claramente que en la figura R43 predominan las células bien teñidas, aunque no muy intensamente, mientras que en la figura R44 predominan las células débilmente reactivas.

En todos los animales, las células aparecían distribuidas por todo el polo, principalmente aisladas y próximas a vasos sanguíneos.

Figura R43: Micrografía de la región Polar mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50

Figura R44: Micrografía de la región Polar mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50



La observación a bajos aumentos de la región polar de la hipófisis en las hembras knock out puso de manifiesto tres grandes diferencias con respecto a las hembras wild type:

El número de células positivas a LH es más elevado.

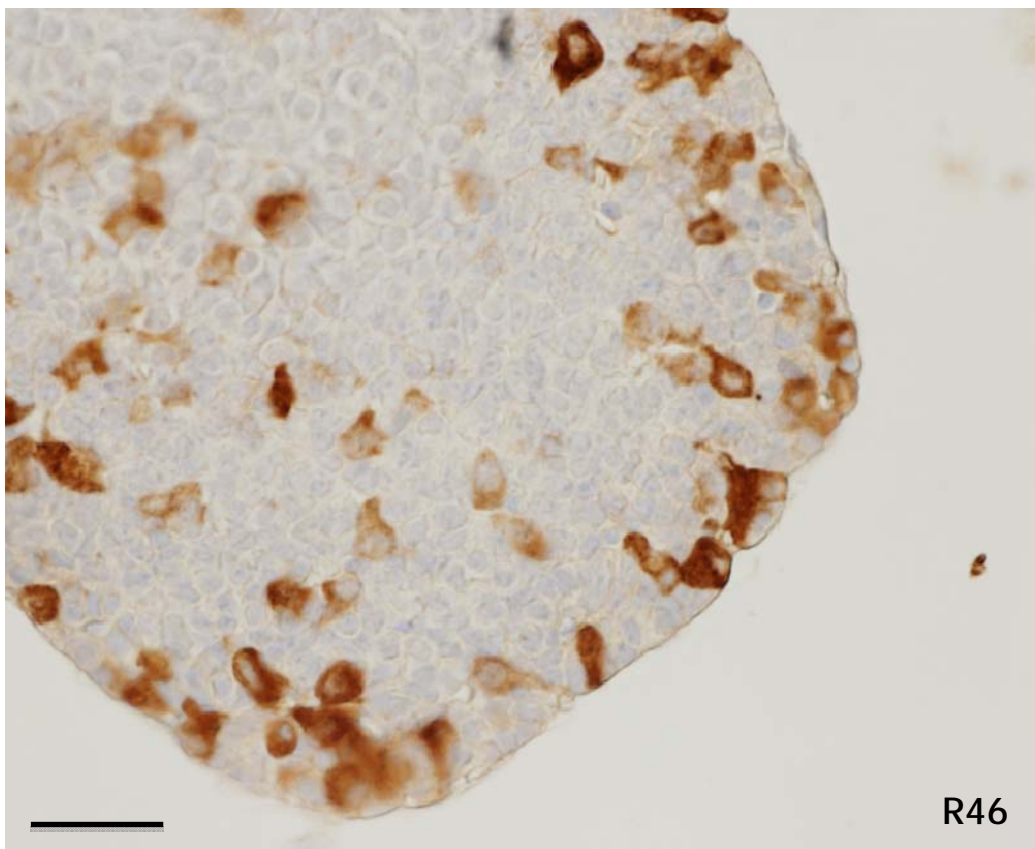
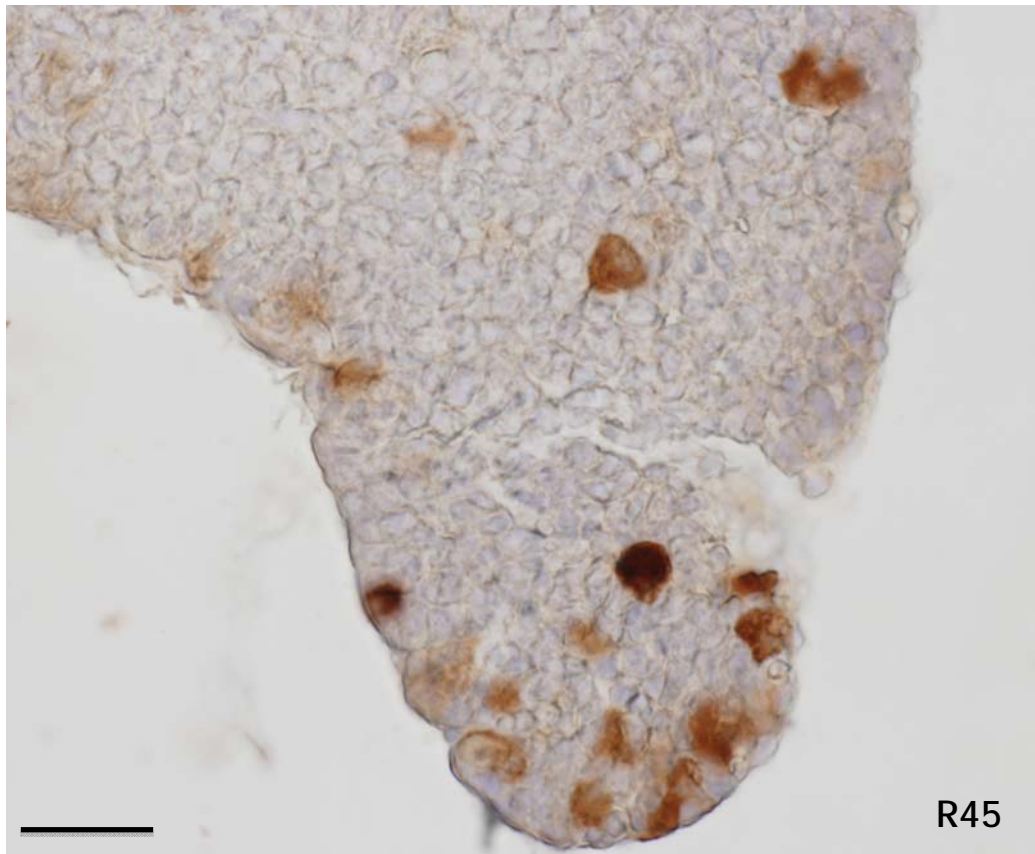
La intensidad de reacción inmunocitoquímica de las células positivas a LH fue mucho mayor.

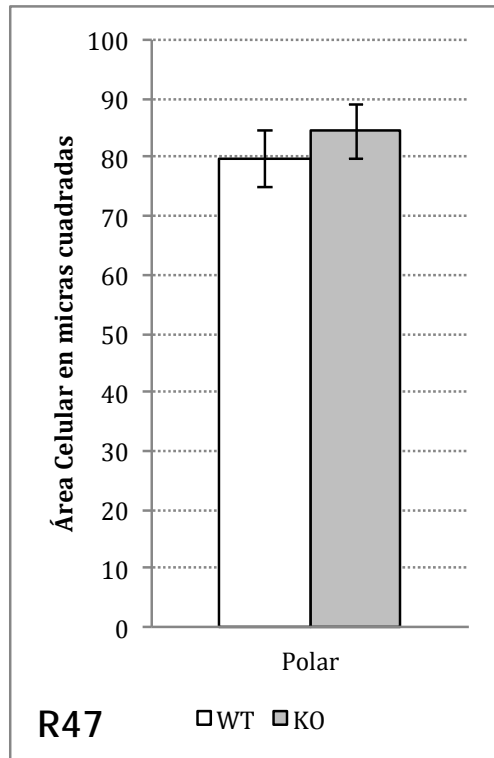
Las células aparecían menos dispersas y aisladas y aparecían muchas células positivas en los márgenes periféricos de la glándula.

Como describiremos más ampliamente a mayores aumentos, las células fueron más irregulares y las células débilmente reactivas mucho más evidentes.

Figura R45: Micrografía de la región Polar mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

Figura R46: Micrografía de la región Polar mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

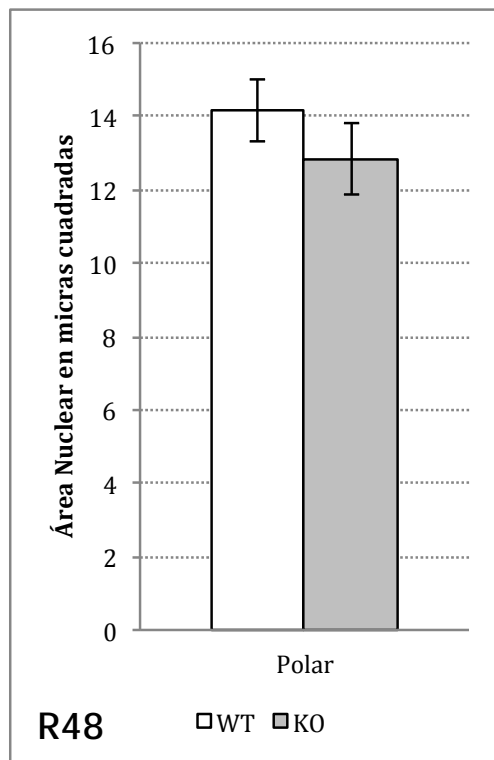




Las diferencias observadas entre las hembras wild type y las knock out al estudiar morfométricamente las células positivas a LH de la región polar, no fueron significativas (figuras R47 y R48).

Como puede apreciarse a altos aumentos en las figuras R49 y R50, las células positivas a LH de la región polar de las hembras wild type, en los mismos planos de sección, presentaron aspecto fundamentalmente poligonal, pero tamaños muy variados (flecha fina vs. flecha gruesa, figura R49).

Estas variaciones en el tamaño de unas células a otras y de sus núcleos fueron las principales responsables de que no hubieran diferencias significativas en el estudio morfométrico.



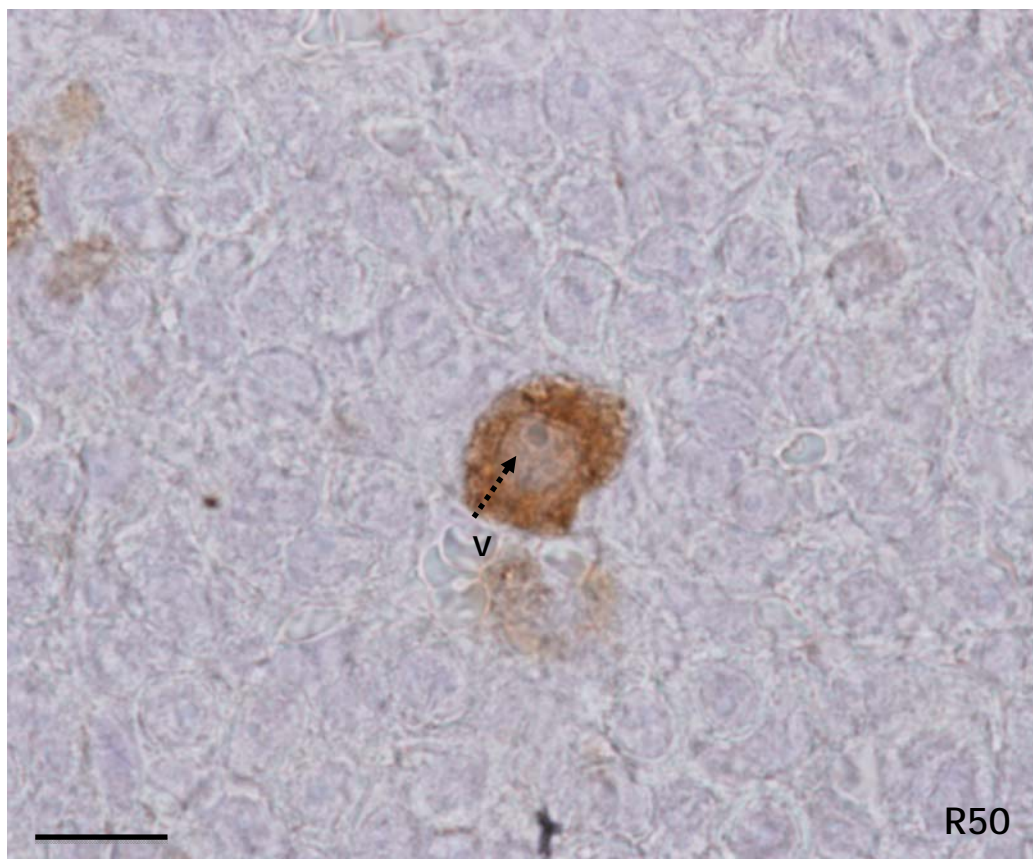
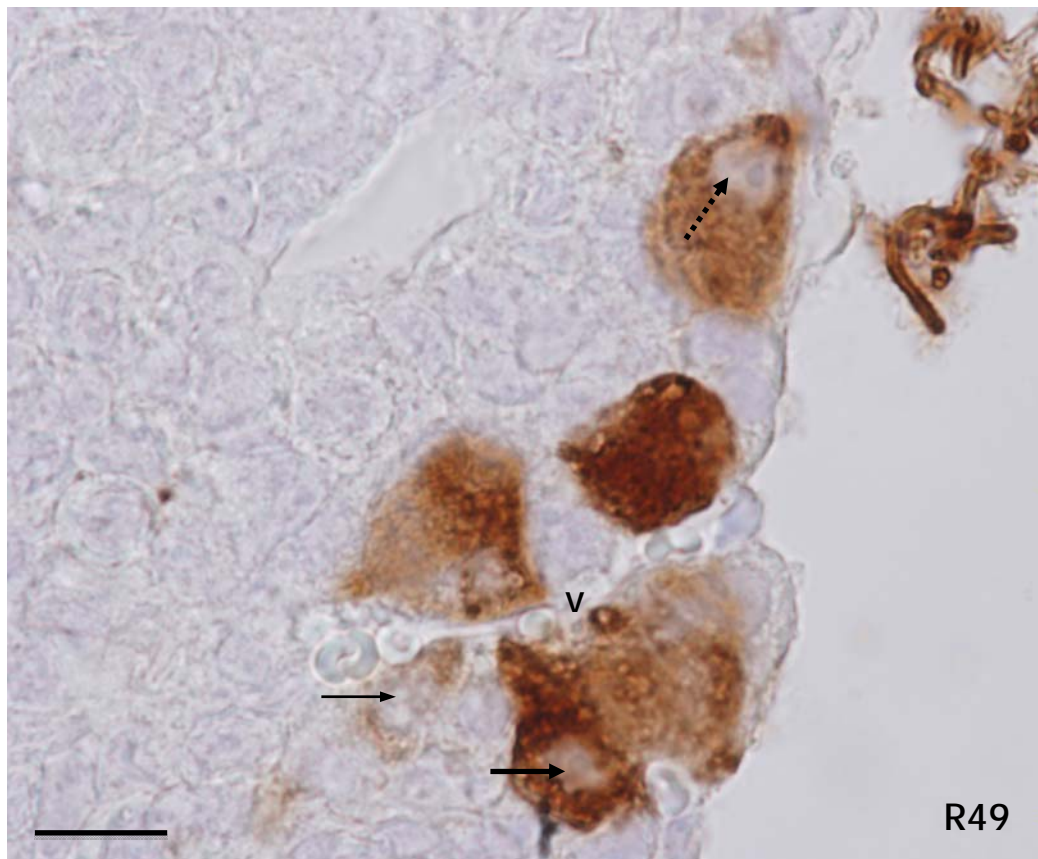
Cuando las células positivas a LH presentaban una intensidad de reacción media y un núcleo grande, por lo general tenían un nucleolo evidente (flecha punteada en figuras R49 y R50).

Aunque en algunas ocasiones, raras, las células aparecían agrupadas muy próximas a un vaso sanguíneo (v, figura R49), lo más frecuente en las hembras wild type fue que las células aparecieran aisladas o formando grupos de dos en dos (figura R50), aunque también contactando con vasos sanguíneos (v).

Figura R49: Micrografía de la región Polar mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x20

Figura R50: Micrografía de la región Polar mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x20

V: vaso sanguíneo.



Las figuras R51 y R52, muestran las células positivas a LH en la región polar de hembras knock out.

En ellas se aprecia bien como estas células ocupan tanto la zona central como los márgenes periféricos de la región.

También ponen de manifiesto la variabilidad celular, así encontramos células poligonales intensa o débilmente reactivas, células con prolongaciones citoplásmicas muy cortas y débilmente reactivas, y células bien reactivas irregulares con prolongaciones citoplásmicas grandes que discurren hacia los vasos sanguíneos (flecha gruesa en figura R51) y que pueden abrazar a células no reactivas (flecha gruesa en figura R52).

El citoplasma por lo general apareció bien reactivo, aunque se diferenciaban dos intensidades de reacción. Muchas células, preferente aunque no exclusivamente las más intensamente teñidas, presentaron la imagen negativa del aparato de Golgi formando un anillo perinuclear (flechas finas en figuras R51 y R52).

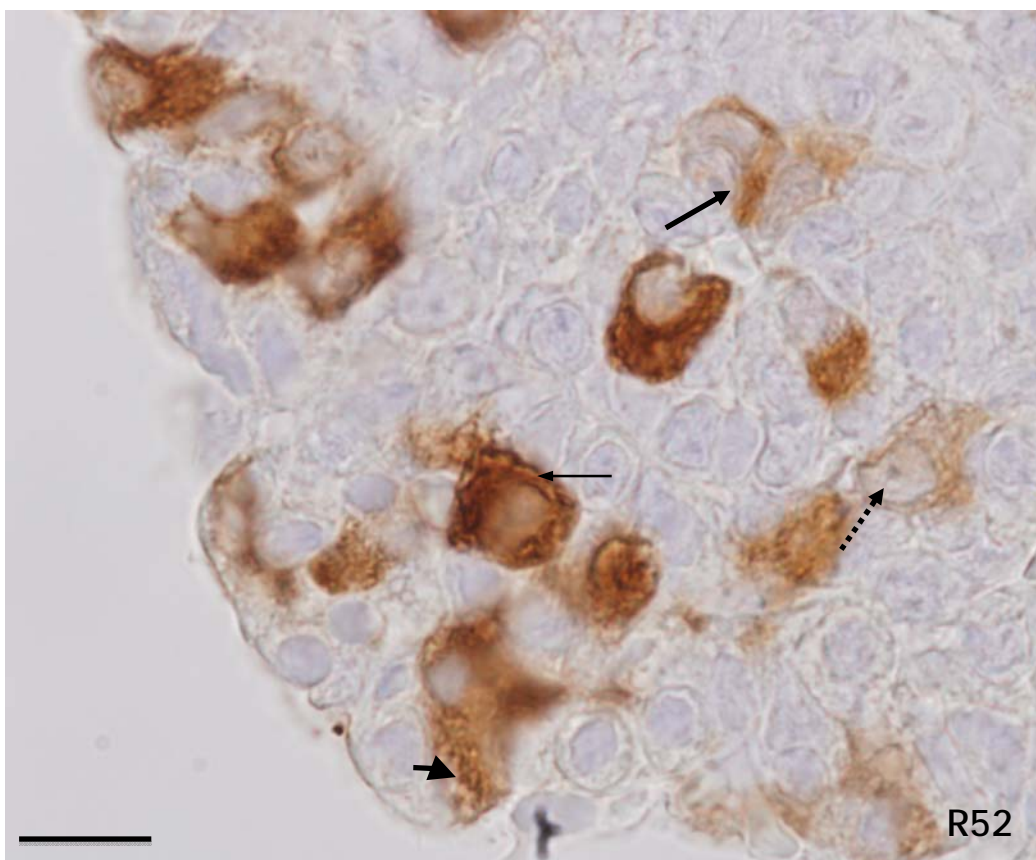
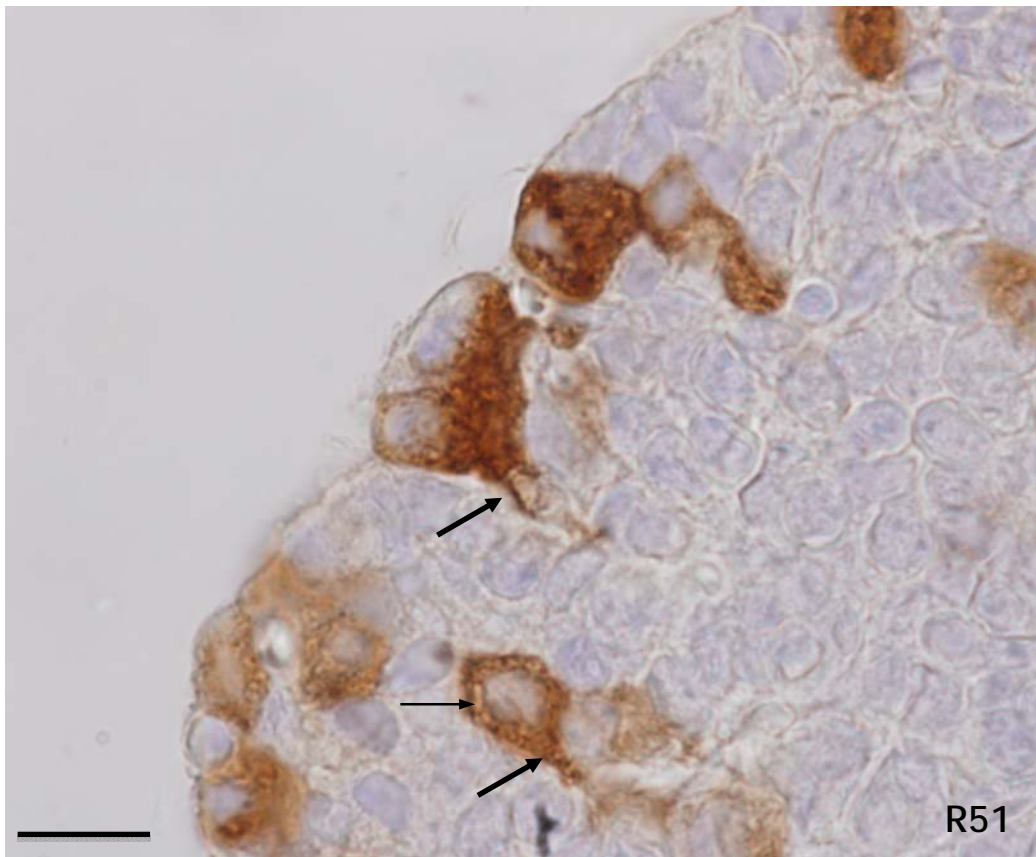
En ocasiones las células presentaron un núcleo muy polarizado y en el polo opuesto del citoplasma imágenes lacunares agrandadas sin reacción inmunocitoquímica (cabeza de flecha en figura R52).

Los núcleos fueron ovalados o levemente rectangulares.

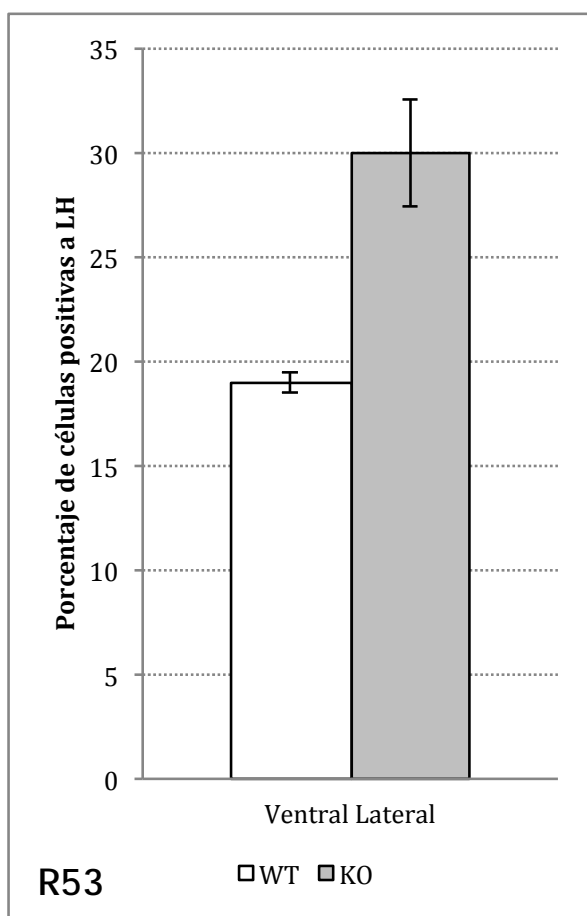
En estos animales, el nucleolo aparecía preferentemente en células con baja intensidad de reacción, núcleo grande y polarizado, imagen negativa del aparato de Golgi perinuclear y aspecto cisternal del citoplasma (flecha punteada en figura R52).

Figura R18: Micrografía de la región Polar mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25

Figura R19: Micrografía de la región Polar mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25



Región Ventral Lateral (3).



La gráfica de la figura R53 pone de manifiesto cuantitativamente algo que de visu es manifiestamente apreciable si se comparan las figuras R54 y R55 con las figuras R56 y R57, el hecho de que las células positivas a LH localizadas en la región ventral lateral de la hipófisis son significativamente más abundantes ($p < 0.01$) en las hembras knock out que en las hembras wild type.

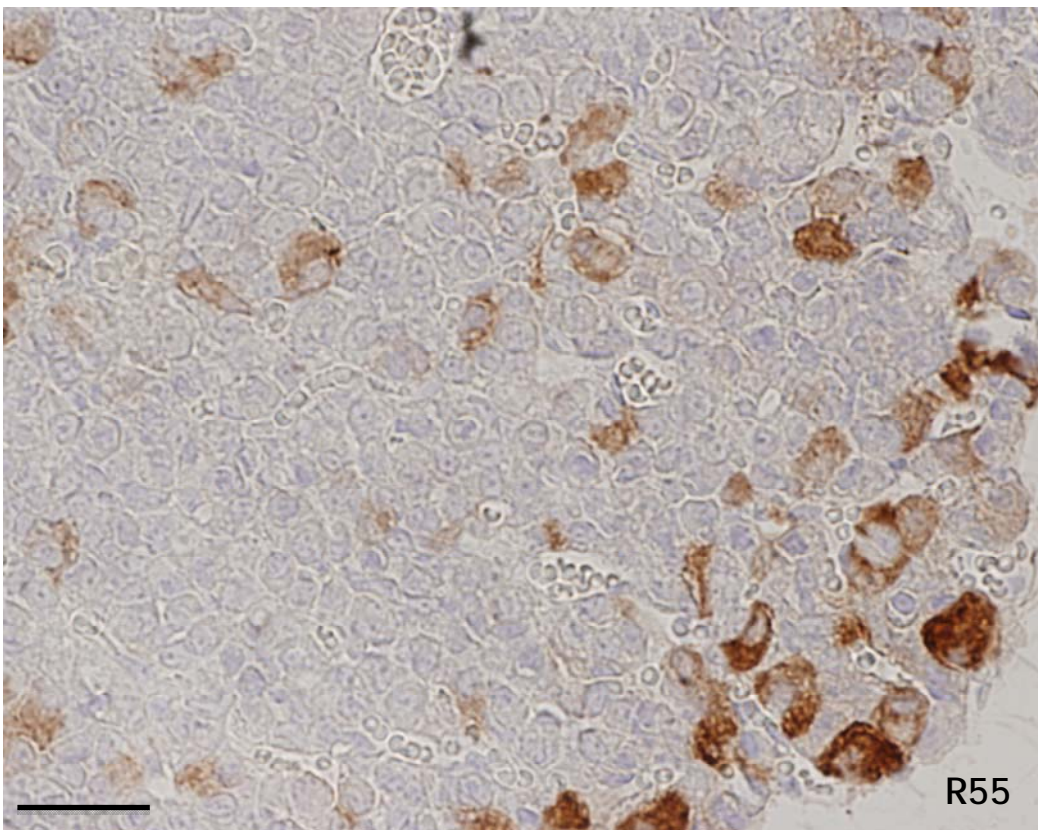
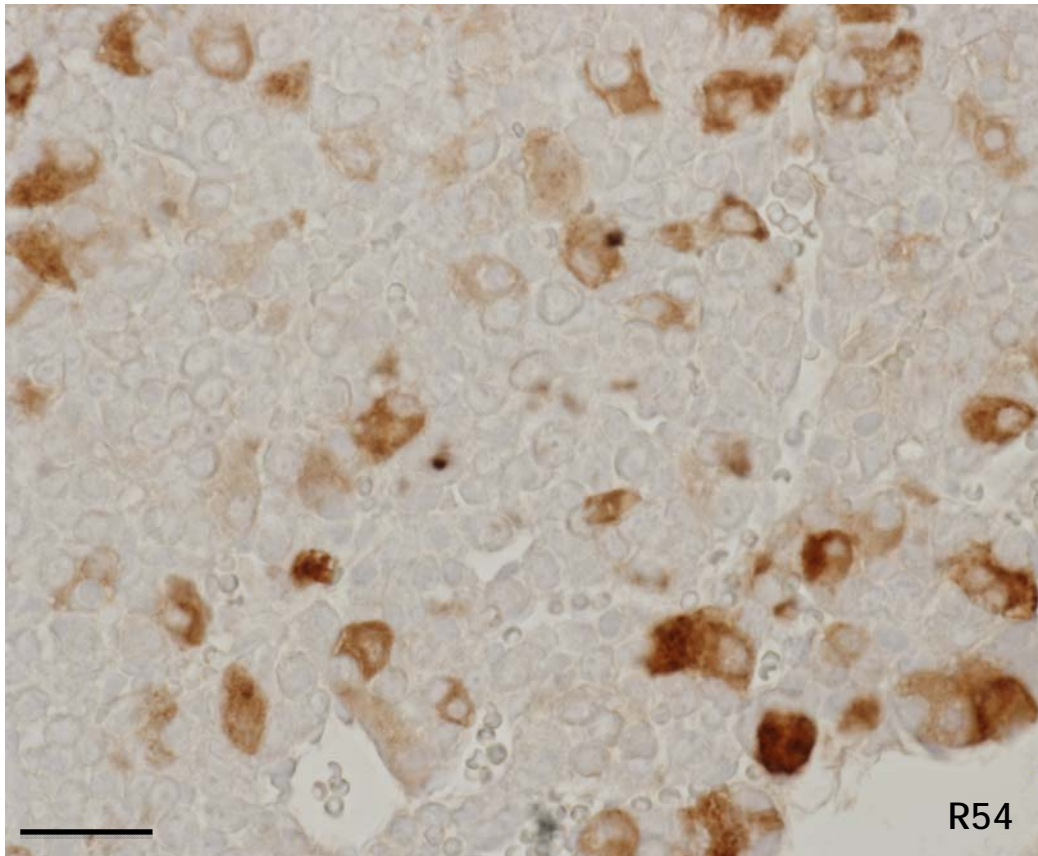
Las células positivas en esta región son algo más numerosas en los márgenes de la glándula que en la profundidad, no obstante también hay células en abundancia hacia el interior de la glándula.

En la periferia es frecuente observar islotes de dos a tres células, mientras que en el interior de la glándula las células suelen estar aisladas.

Si bien hay células débil e intensamente reactivas en ambas localizaciones, en la periferia predominan las células intensamente reactivas y en el interior las débilmente reactivas.

Figura R54: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50

Figura R55: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50



La región ventral lateral de la hipófisis de las hembras knock out presentaron gran cantidad de células positivas a LH (figuras R56 y R57).

Al margen de la densidad de población de células positivas, con respecto a las hembras wild type se apreciaron claras diferencias:

En primer lugar, las variaciones entre la zona marginal y la zona interna de la región no eran tan apreciables, de hecho como se observa principalmente en la figura R56, no hubo transición entre la zona marginal y la profunda.

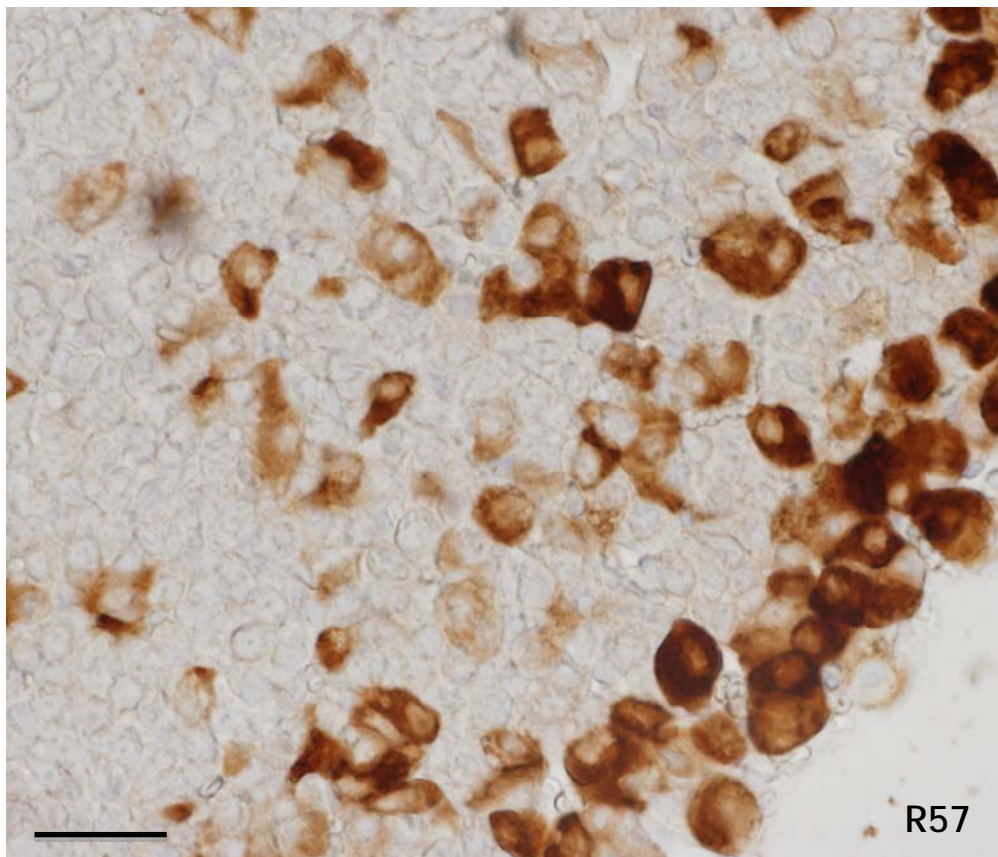
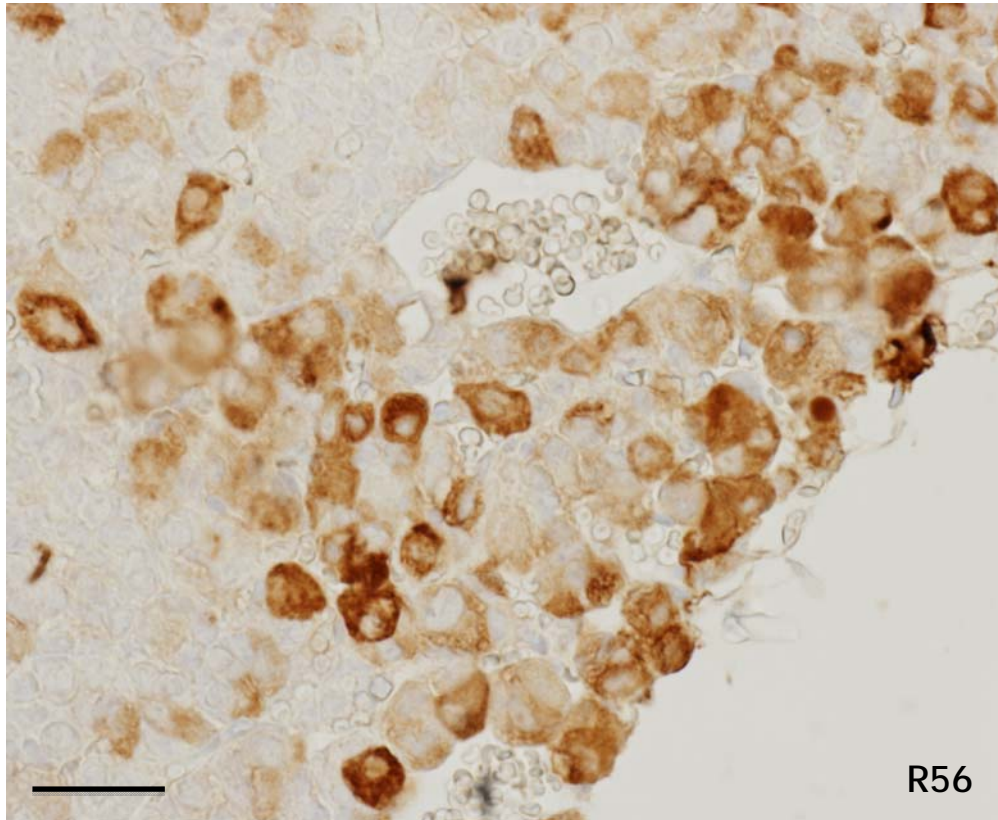
En segundo lugar, los islotes y agrupaciones de células fueron muy evidentes, en ocasiones esos grupos celulares estaban formados por más de diez células positivas a LH (figura R57).

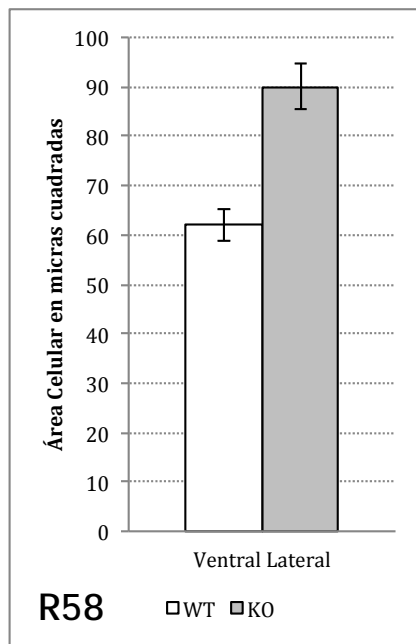
Además, las células presentaron mayor intensidad de reacción y las células fuertemente reactivas eran más numerosas.

Por último destacar que estos animales presentaron más vasos sanguíneos y de mayor tamaño que los wild type (figura R56).

Figura R56: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

Figura R57: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

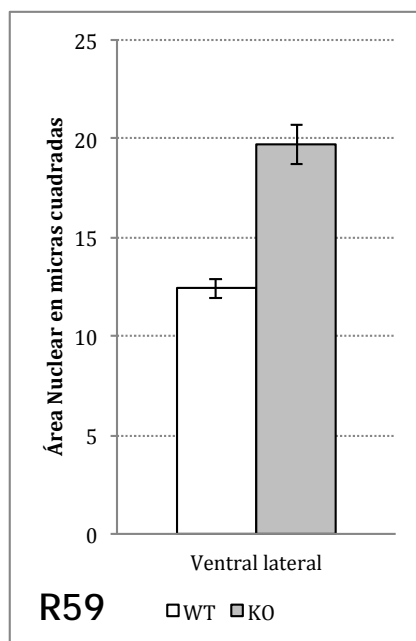




Las células positivas a LH en la región ventral lateral de las hembras wild type fueron discretamente más pequeñas que las observadas en otras regiones, aunque estas diferencias sólo fueron significativas con respecto a las regiones dorsal, polar, ventral medial y dorsal infracavitaria ($p < 0.05$).

Como puede apreciarse en la gráfica de la figura R58 el área celular en las hembras knock out fue significativamente mayor que la observada en las hembras wild type ($p < 0.01$).

Un cambio semejante, aunque más acentuado se apreció al estudiar el área nuclear (figura R59). Las hembras knock out presentaron núcleos mucho mayores, casi el doble que las hembras wild type ($p < 0.005$).



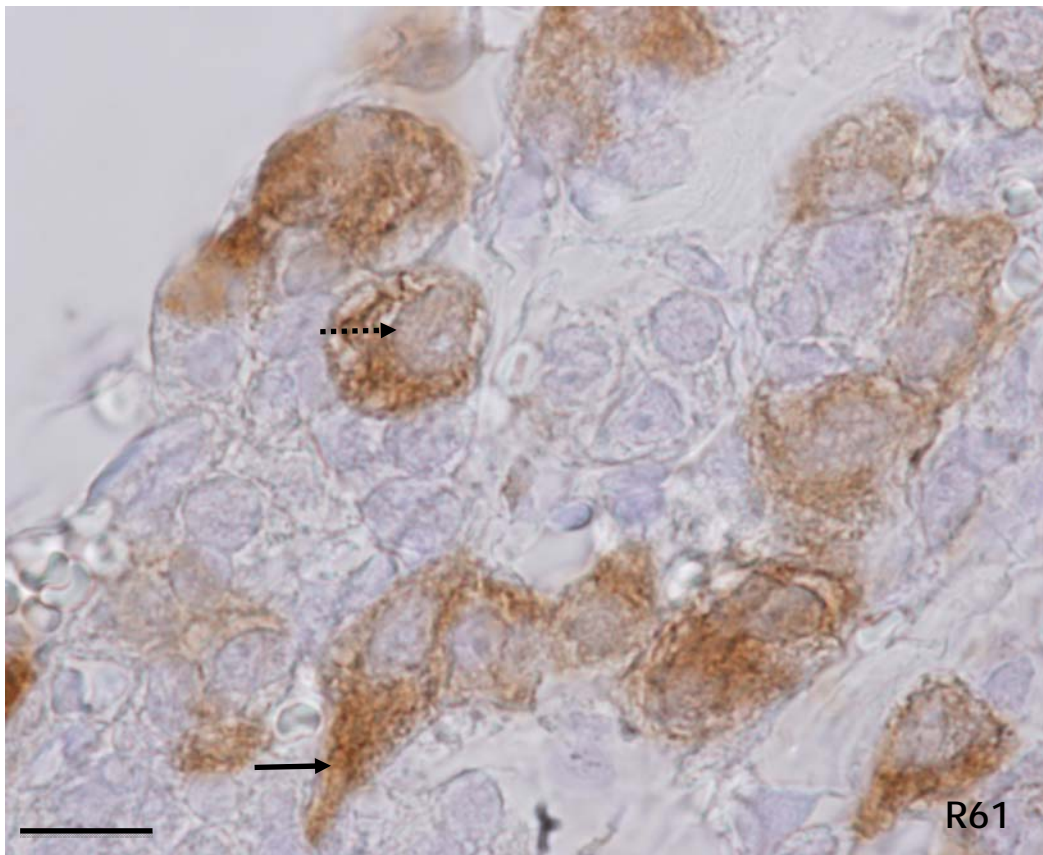
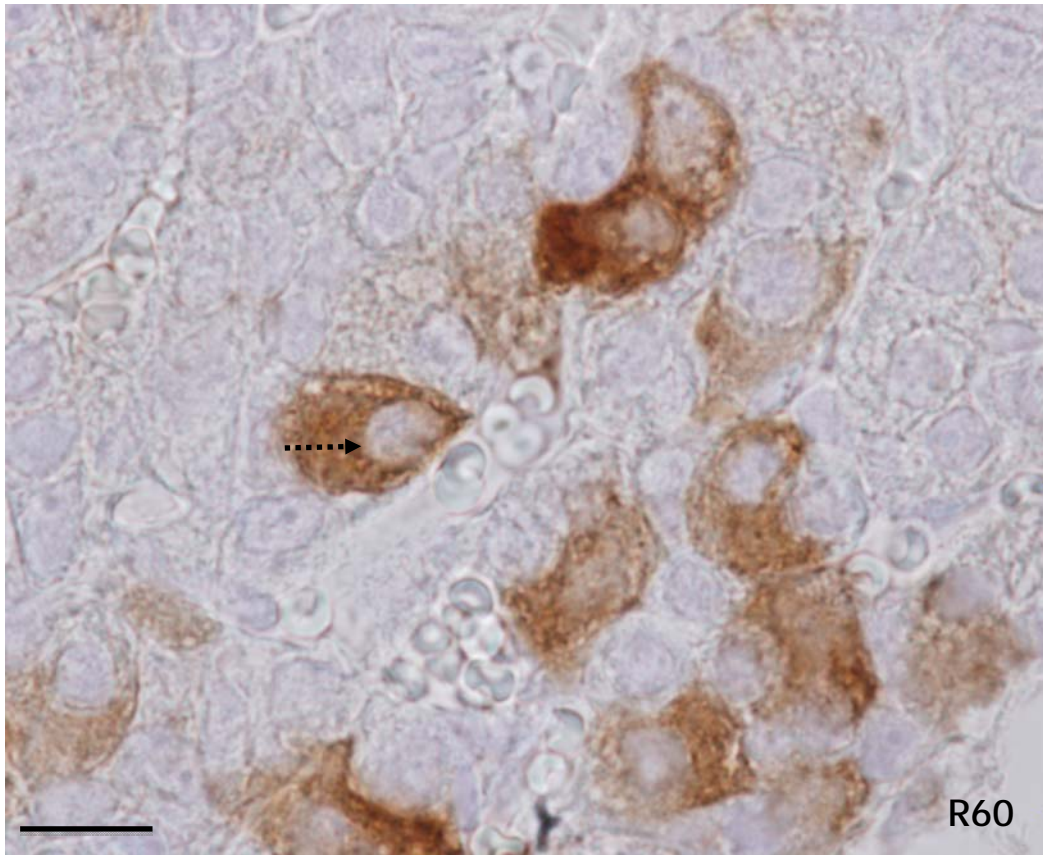
Las células positivas a LH en las hembras wild type fueron muy polimorfas, junto a células redondeadas se observaron células poligonales o células con grandes y largas expansiones citoplásmicas (flecha en figura R61). Aunque no de manera frecuente, tampoco fue raro observar células que abrazaban a otras células hipofisarias no reactivas a LH.

Los núcleos fueron redondeados u ovales, muchas veces desplazados hacia un polo de la célula, no siendo raro que dicho polo celular fuera el que estaba en contacto con los vasos sanguíneos (flecha discontinua en figuras R60 y R61). Eran núcleos hipocromáticos y en ocasiones con nucléolo evidente.

Los citoplasmas presentaron un aspecto granular fino, alguna célula presentaba imágenes negativas del aparato de Golgi o de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso.

Figura R60: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25

Figura R61: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25



El estudio a altos aumentos de microscopio de las células positivas a LH en la región ventral lateral de la hipófisis de las hembras knock out permitió observar detalles que a pequeños aumentos pasaron desapercibidos.

Como muestra la figura R62, células que a bajos aumentos parecían negativas realmente son positivas a LH (flechas finas) pero presentan un citoplasma velado con una reacción granular casi puntiforme. Estas células presentaron casi siempre un núcleo hipocromático, ovalado y sin nucleolo. A veces de gran tamaño (asterisco en figura R62).

Las células positivas a LH en esta región se encontraban inmersas dentro de una malla vascular que se evidenció por la aparición de multitud de vasos cortados interpuestos entre las células (v en figuras R62 y R63).

La relación de las células con los vasos se desarrollaba de dos formas distintas, o bien las células contactaban por uno de sus laterales con el vaso o emitían prolongaciones citoplásmicas gruesas que iban hacia el vaso (flechas discontinuas en figura R62). No era raro observar que en ocasiones las células contactaban con más de un vaso sanguíneo.

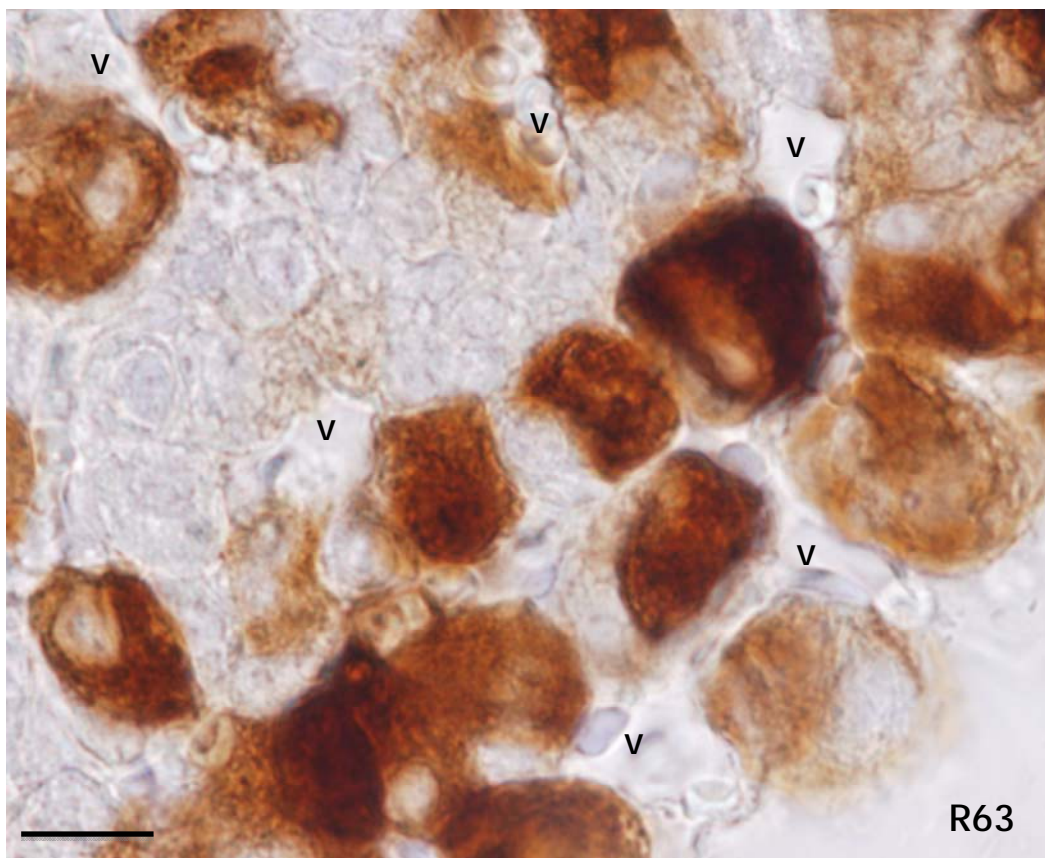
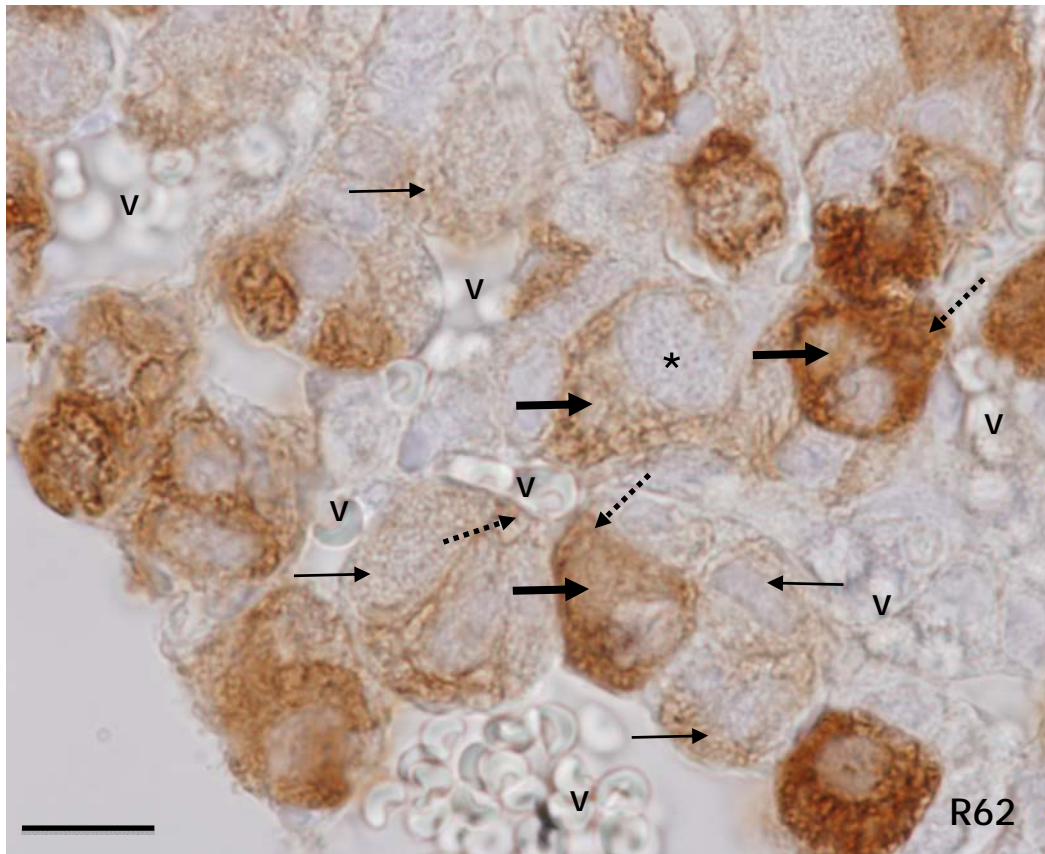
Estas prolongaciones le daban un aspecto poligonal a las células. En ellas, la disposición del núcleo era hacia el polo avascular. Además, en estas células se observó una imagen negativa del aparato de Golgi de gran tamaño dispuesto en el espacio en el que el citoplasma, desde el núcleo, se dirigía hacia el vaso (flechas gruesas en figura R62).

Tal y como se muestra en la figura R63, en esta región también se hallaron células positivas a LH intensamente reactivas, con una reacción uniforme que ocupaba todo el citoplasma y que incluso dificultaba la visualización del núcleo.

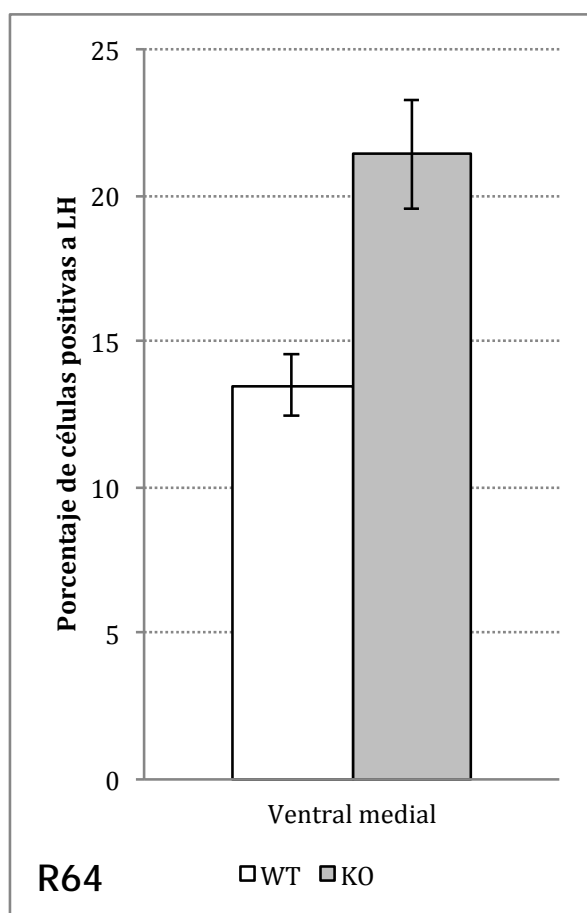
Alguna célula, aunque mucho menos frecuentemente que en otras regiones hipofisarias de estos animales y que en la región ventral lateral de las hembras wild type, presentó vacuolizaciones citoplásmicas correspondientes al retículo endoplásmico rugoso.

Figura R62: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25

Figura R63: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25



Región Ventral Medial (2).



La región ventral medial de la hipófisis es la zona más estrecha de la porción ventral de la glándula. En su recorrido de rostral a caudal, cuando alcanza el punto de mayor desarrollo del lóbulo neural se transforma en un cordón de células que, en ocasiones tiene 3 ó 4 células de dorsal a ventral, desde el límite más ventral de la pars intermedia hasta el borde ventral de la glándula.

Por ello, las consideraciones de marginal y profundo que pueden hacerse en la región ventral lateral, en la ventral medial pueden hacerse allí donde el lóbulo neural adquiere escaso desarrollo.

El porcentaje de células positivas a LH en esta región es menor que el observado en la región ventral lateral ($p < 0.05$). Esta diferencia afectó de igual manera a las hembras wild type que a las knock out.

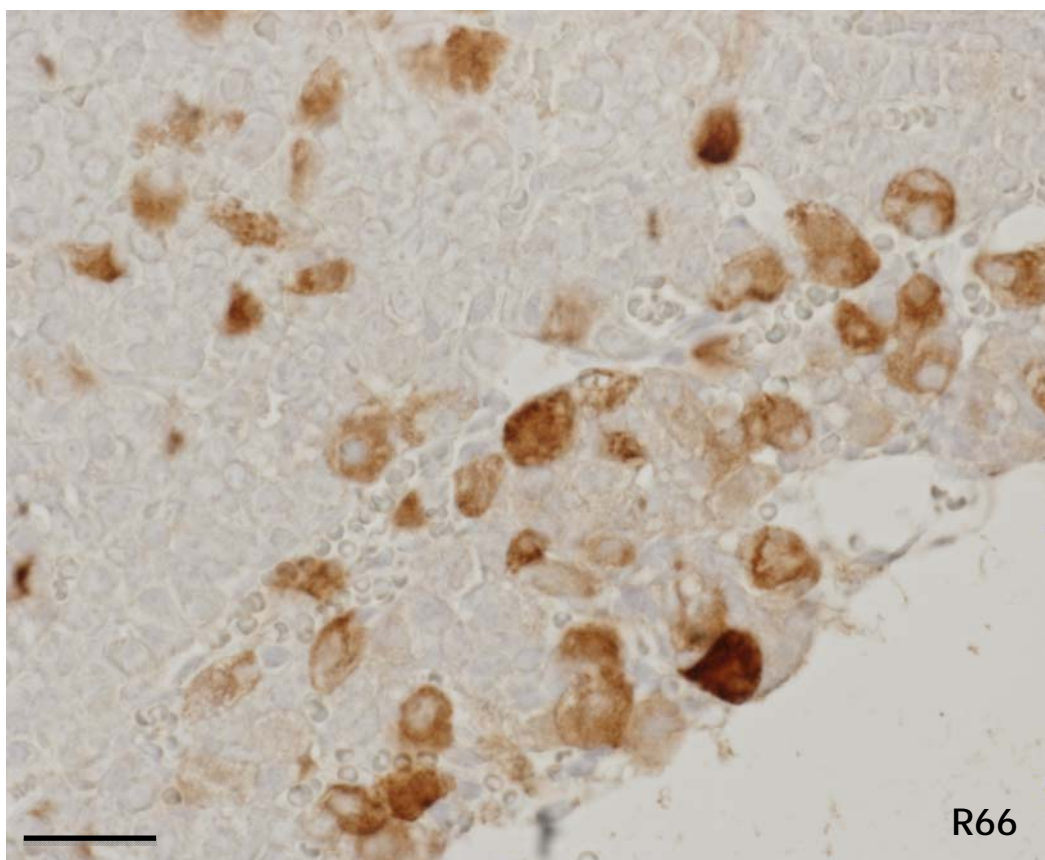
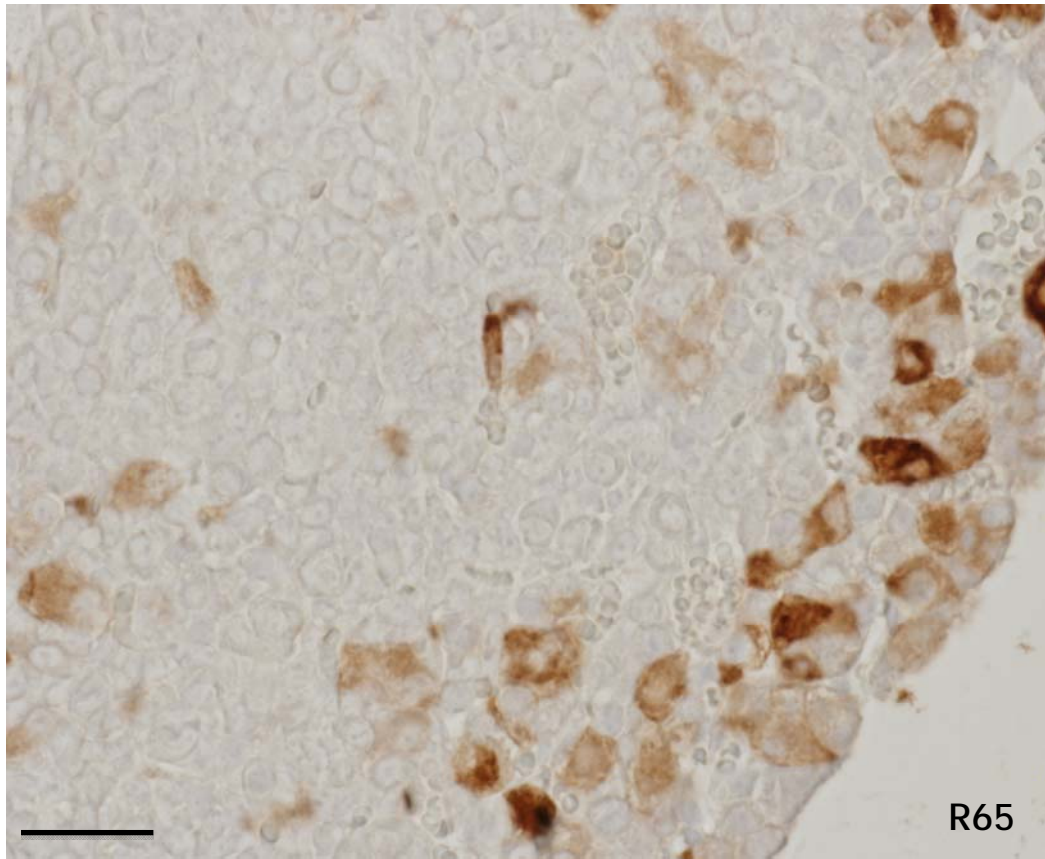
Como se aprecia claramente en la gráfica de la figura R64, el porcentaje de células positivas a LH de esta región fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en las hembras knock out que en las wild type.

En las hembras wild type, las células positivas a LH aparecían próximas entre sí, aunque sin formar islotes y, generalmente, estaban próximas a gruesos vasos sanguíneos (Figuras R65 y R66).

En las dos imágenes se constata que la intensidad de reacción del citoplasma permitía de visu diferenciar tres poblaciones, fuerte, media y débilmente teñidas.

Figura R65: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50

Figura R66: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50



Las diferencias porcentuales que hemos descrito anteriormente entre las hembras wild type y las knock out se manifestaron de forma distinta dependiendo de en qué porción rostro-caudal de la región se realizara la cuantificación celular.

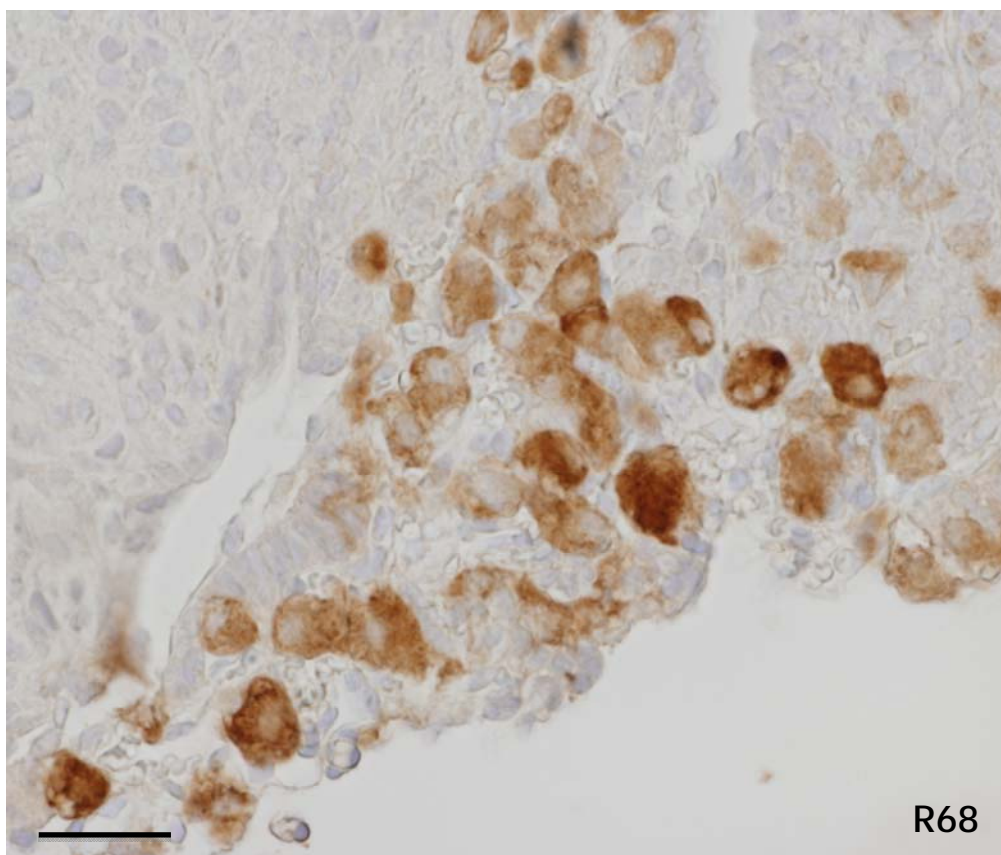
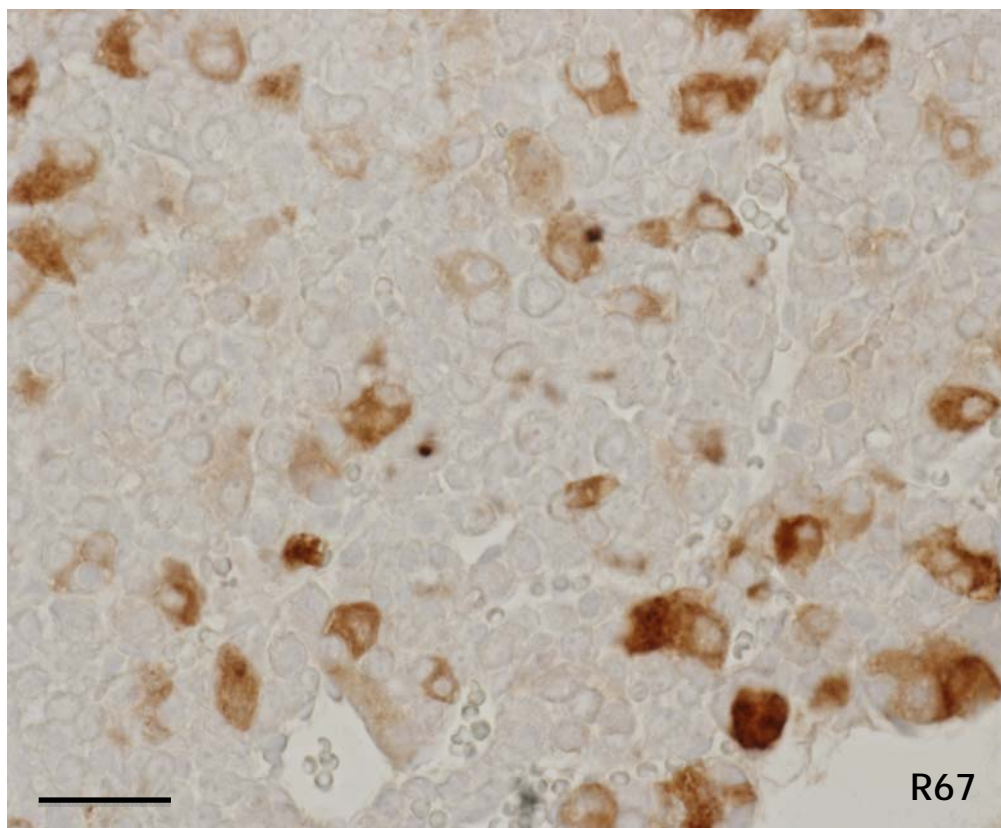
Como puede apreciarse en las figuras R67 y R68 la distribución de las células positivas a LH allí donde el lóbulo neural estaba poco desarrollado (figura R67) el aspecto de visu es bastante semejante al observado en las hembras wild type, aunque habían más células positivas en la zona profunda de la región.

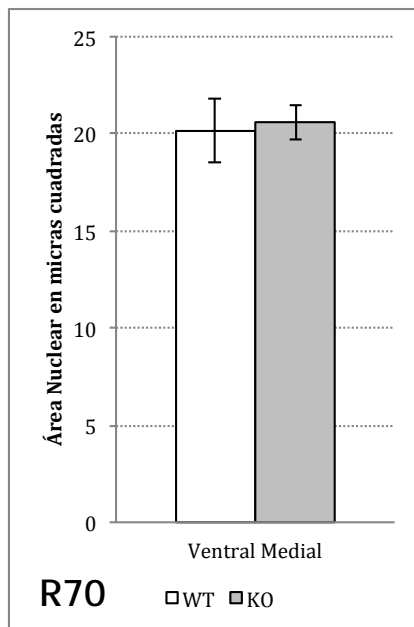
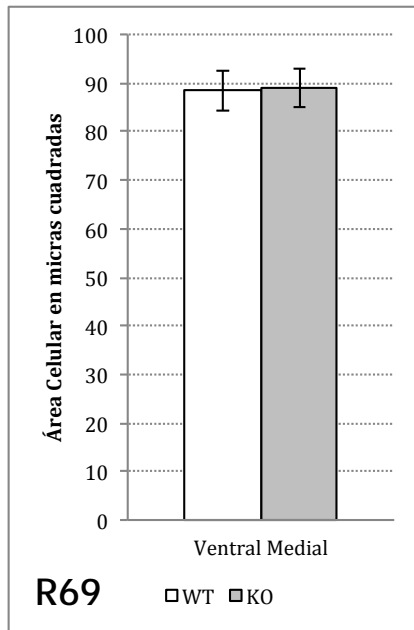
Como se representa en la figura R68, el zona de la región en la que el lóbulo neural es más amplio, lo que sitúa muy ventral a la pars intermedia (PI) la mayoría de las células aparecían como células positivas a LH, de manera que prácticamente estaban separadas tan solo por los vasos sanguíneos.

Aunque los tres patrones de reacción descritos para las hembras wild type también se observaron en las knock out, las células intensamente reactivas fueron más evidentes en éstas últimas.

Figura R67: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

Figura R68: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50





Las figuras R71 y R72, para las hembras wild type, y las figuras R73 y R74, para las knock out, son un claro exponente de cómo en la región ventral medial de la hipófisis hay dos poblaciones de células positivas a LH, en lo que se refiere a su tamaño, de manera que junto a células grandes (flecha fina en la figura R71) aparecieron células mucho más pequeñas (flechas discontinuas en figura R71).

Este hecho se refleja claramente en el estudio estadístico del análisis morfométrico que se representa en las gráficas de las figuras R69 y R70.

No se encontraron diferencias significativas en el tamaño celular (figura R69) ni en el nuclear (figura R70) en las células positivas a LH de la región ventral medial al comparar las hipófisis de las hembras wild type con las de las hembras knock out.

Las células positivas a LH de la región ventral medial de las hembras wild type (figuras R71 y R72) fueron muy polimorfas, sin patrones definidos en su forma, tamaño o intensidad de reacción.

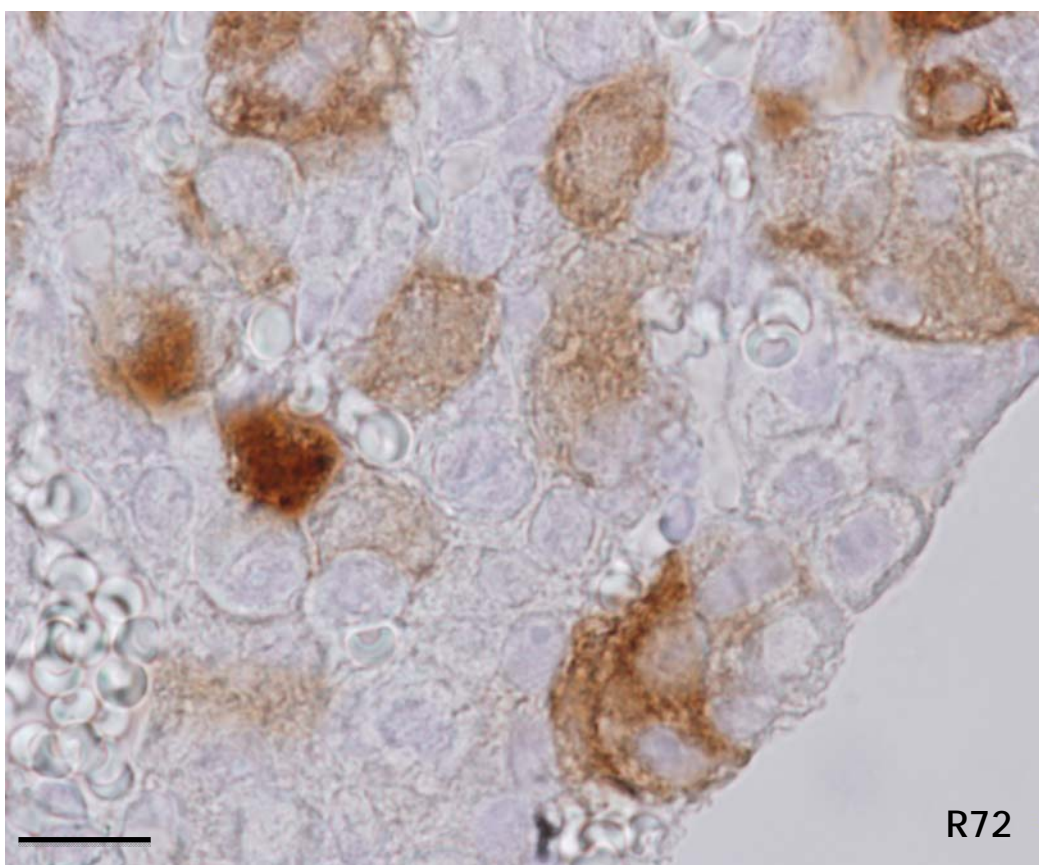
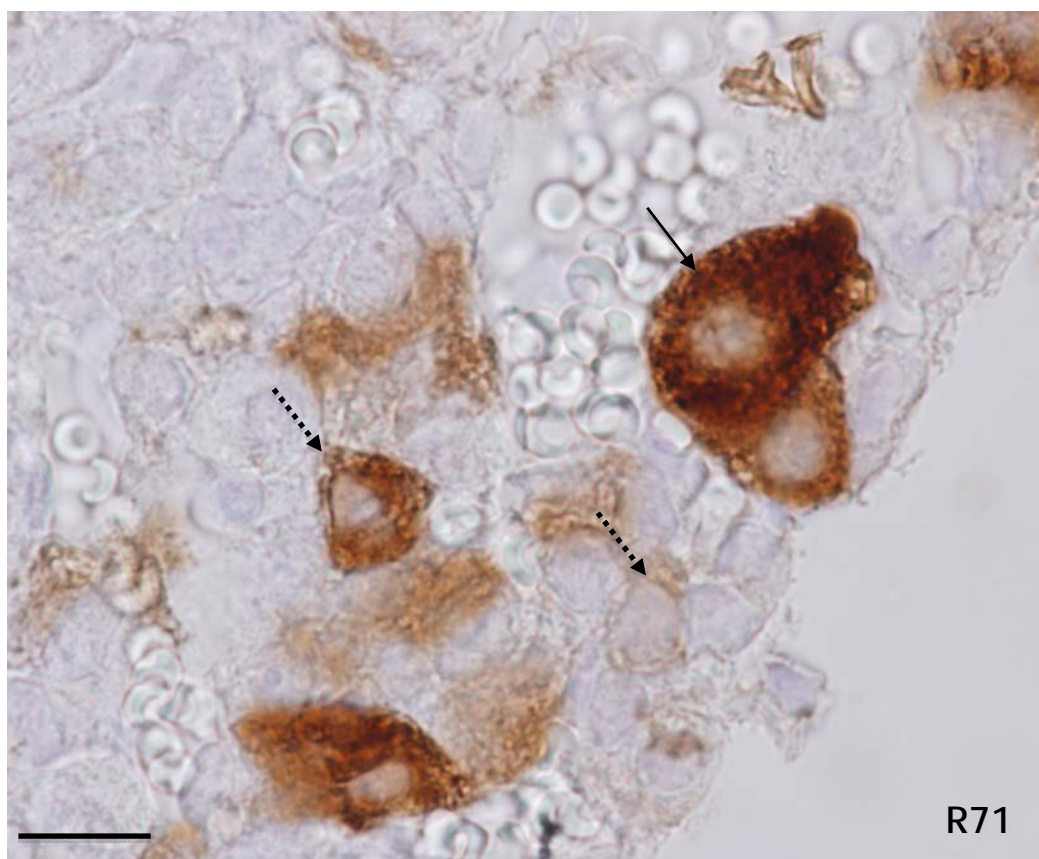
El citoplasma apareció teñido de forma homogénea independientemente de la intensidad de la reacción.

Los núcleos, generalmente redondeados, hipocromáticos y sin nucléolos, casi siempre se disponían en el centro de la célula.

Rara vez se apreciaron imágenes negativas del aparato de Golgi o cisternas del retículo endoplásmico rugoso.

Figura R71: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25

Figura R72: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25



Las figuras R73 y R74 son un claro exponente de cómo la región ventral medial presenta células de gran tamaño junto a otras células mucho más pequeñas, también en las hembras knock out, lo que sugiere que ésta es una característica de las células positivas a LH situadas en esta región y, puesto que es un hecho que se da por igual en wild type que en knock out, no guarda relación con la presencia o no de aromatasa.

En estos animales, las células también fueron muy irregulares, con núcleos ovales o redondeados, a veces con nucleolo, que generalmente estaban desplazados hacia un polo celular.

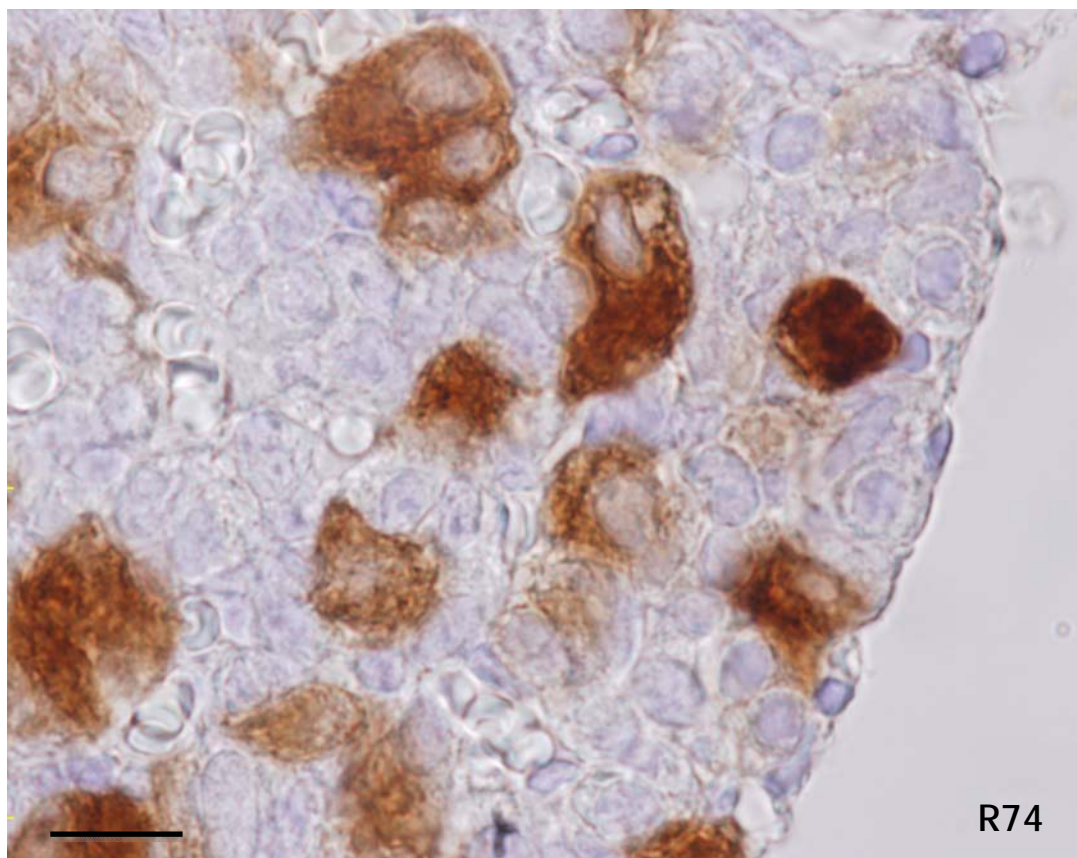
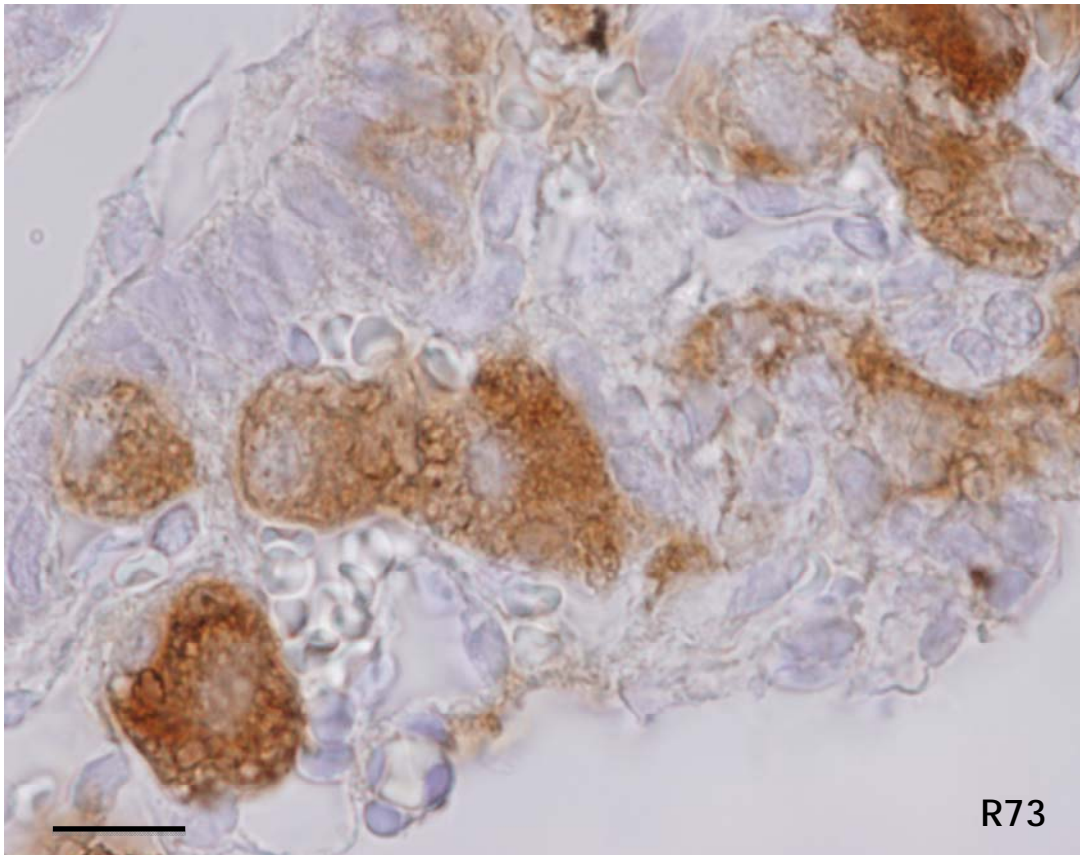
La presencia de imágenes lacunares de retículo endoplásmico rugoso fueron muy frecuentes y, a veces, como se observa en la figura R74 muy evidentes.

Los citoplasmas aparecieron homogéneamente teñidos, en ocasiones, sobre todo en células intensamente reactivas, con imagen negativa del aparato de Golgi perinuclear.

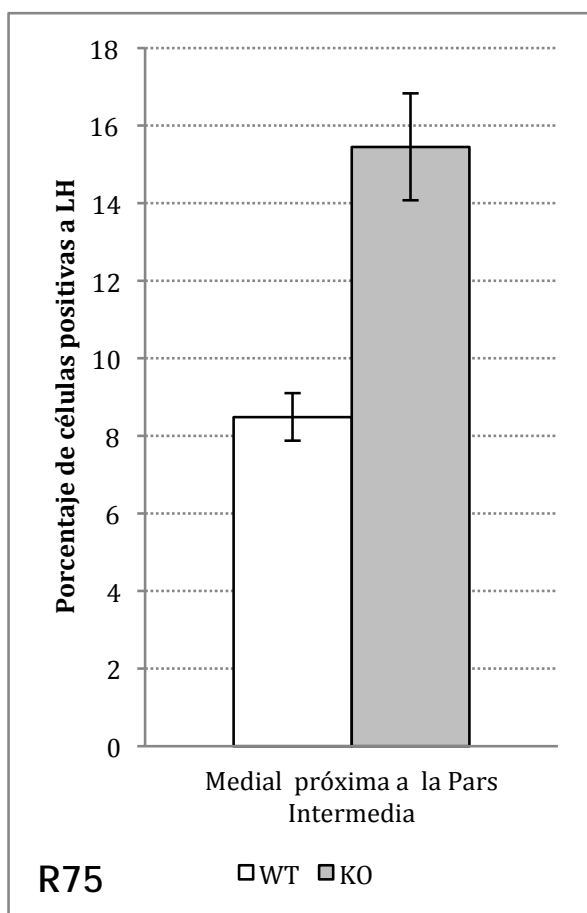
Al igual que en la región ventral lateral, las células guardaban estrecha relación con vasos sanguíneos.

Figura R73: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25

Figura R74: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25



Región Medial próxima a la Pars Intermedia (9).



Las células positivas a LH de esta región, en las hembras wild type fueron más escasas que en otras regiones de la hipófisis ($p < 0.05$ con respecto a las regiones dorsal tuberal, lateral, ventral lateral y ventral medial).

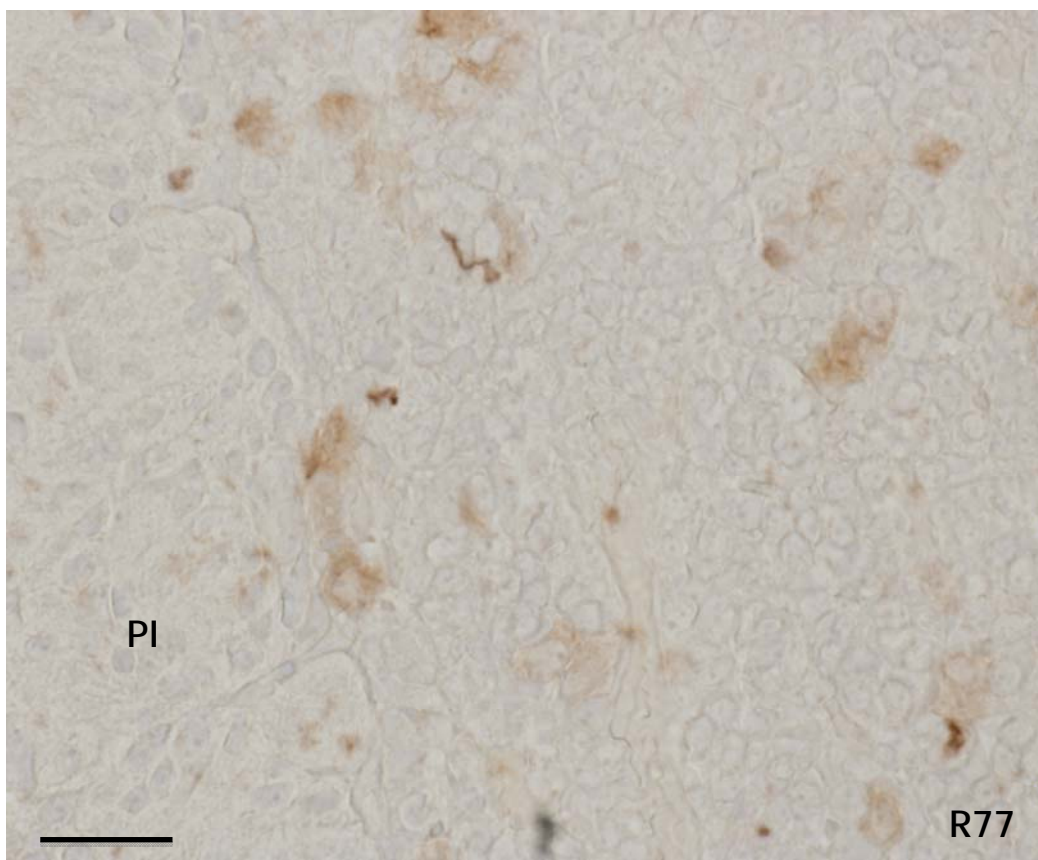
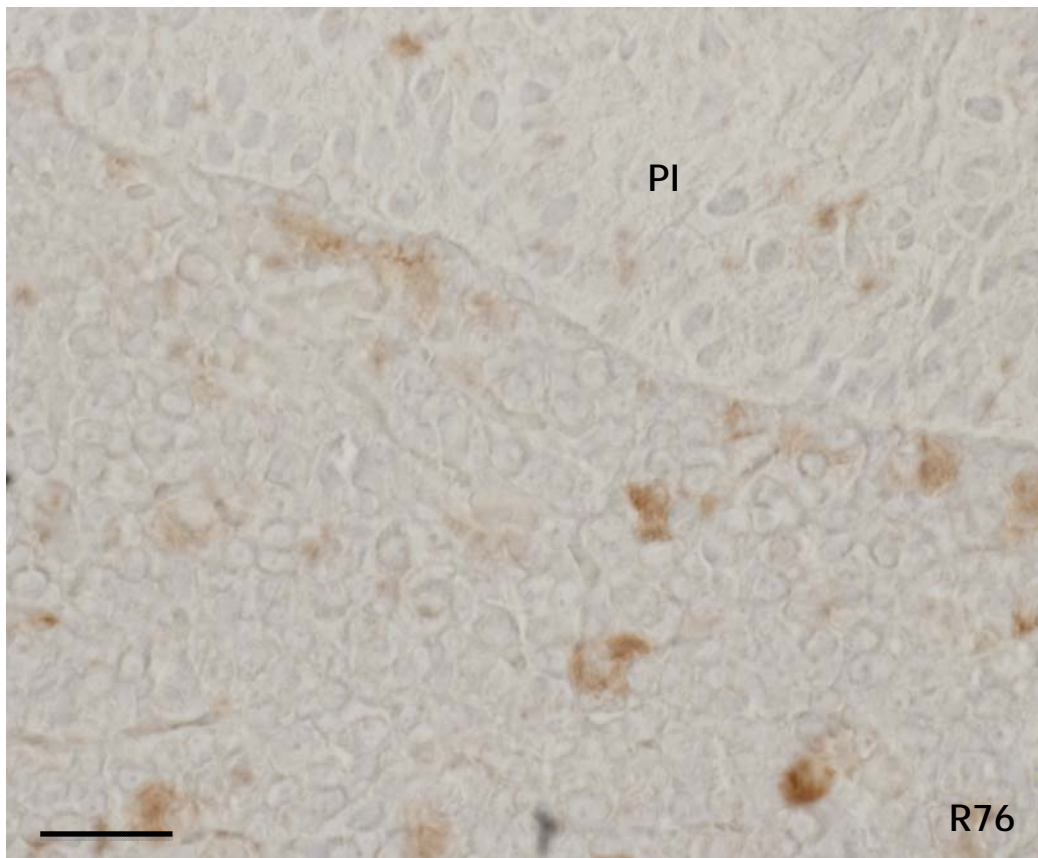
La ausencia de aromatasa en los animales knock out, provocó que la población de células gonadotropas positivas a LH fuera casi el doble que la observada en los wild type (figura R75), diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0.005$).

En las hembras wild type, éstas células aparecían aisladas y débilmente reactivas, dejando grandes espacios sin células positivas a LH (figuras R76 y R77).

Aunque eran algo más frecuentes en la zona próxima al límite de la caverna hipofisaria y por tanto a la pars intermedia, eso no supuso una localización preferente.

Figura R76: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en una wild type. Barra x50

Figura R77: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en una wild type. Barra x50
PI: Pars Intermedia



En las hembras knock out, las células positivas a LH de esta región no sólo eran más numerosas que en las hembras wild type, sino también mucho más reactivas. Si en las wild type todas las células aparecían con un patrón poco reactivo, en las knock out, prácticamente todas las células aparecían intensamente reactivas.

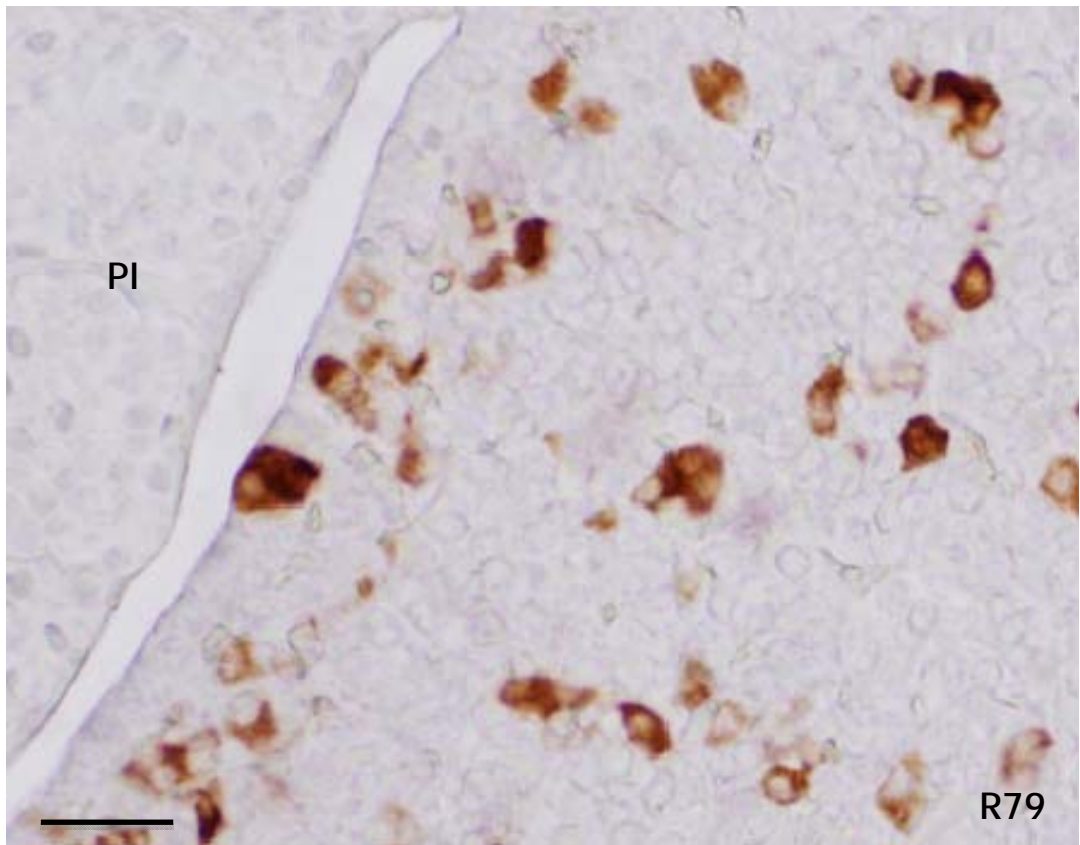
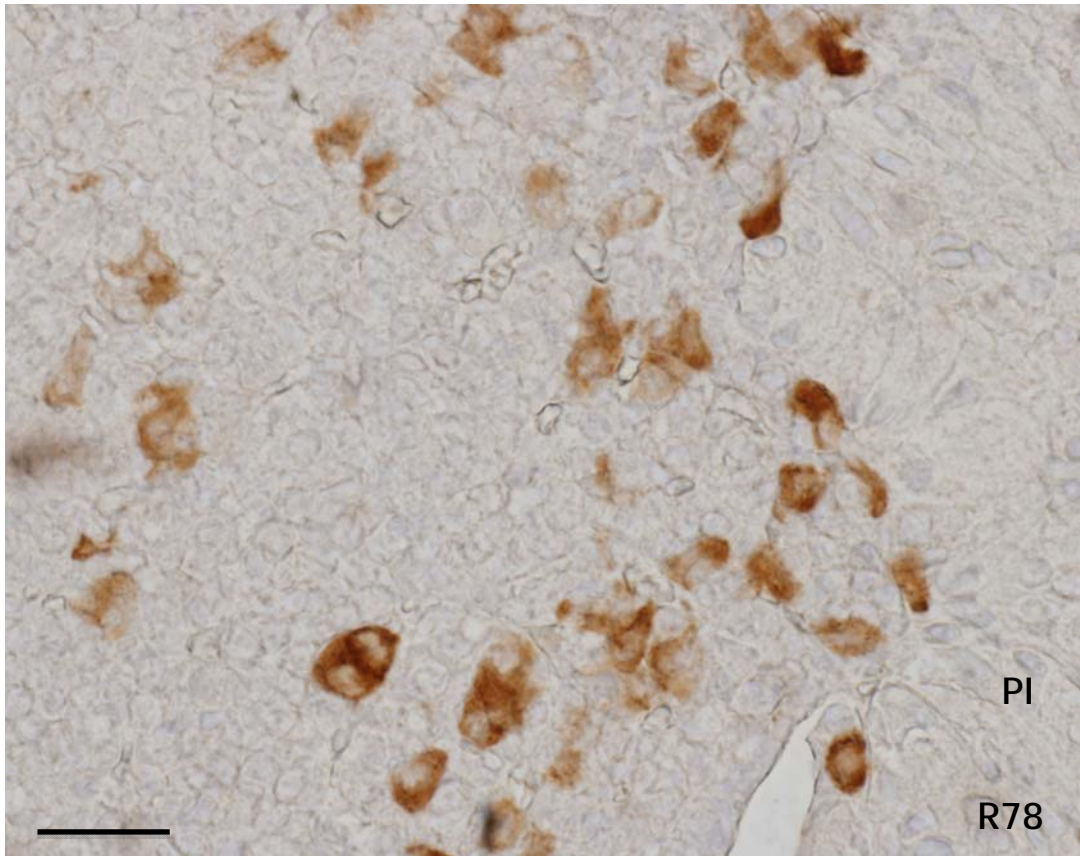
A pesar de ser siempre más reactivas que en las wild type, en estos animales la intensidad de la tinción varió ligeramente de unos animales a otros, como puede observarse al comparar a bajos aumentos las células de las figuras R78 y R79.

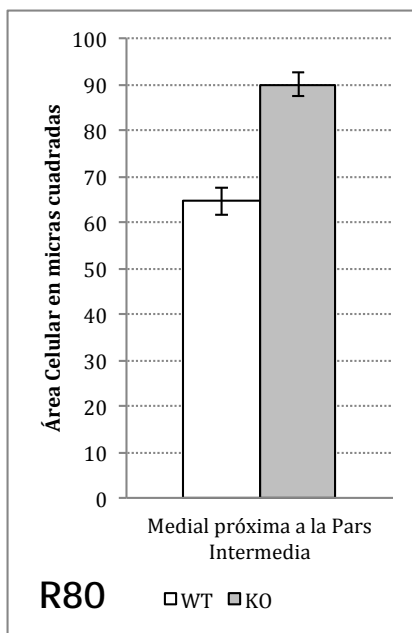
En las hembras knock out las células positivas a LH aparecieron aisladas o formando pequeños islotes celulares de 3 ó 4 células.

Aunque en ocasiones aparecieron células en contacto con la caverna hipofisaria y por tanto próximas a la pars intermedia (PI) la localización preferente de las células positivas fue lejos del epitelio limitante de la caverna.

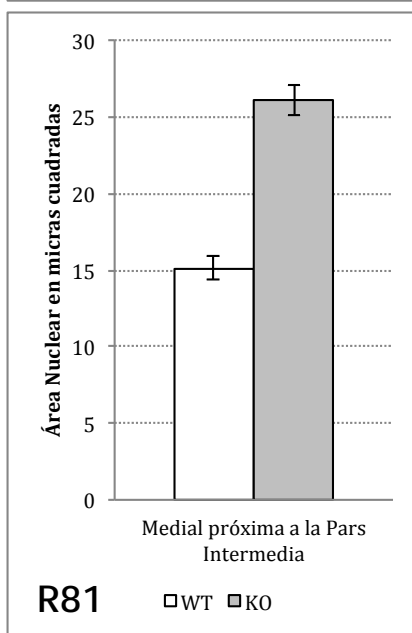
Figura R78: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

Figura R79: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50
PI: Pars Intermedia





Las diferencias en el porcentaje de células positivas a LH y en la intensidad de tinción, observadas en la región medial próxima a la pars intermedia entre hembras wild type y hembras knock out, se acompañó, como muestra la figura R80 de un aumento significativo ($p < 0.01$) del área celular y de un aumento muy notable ($p < 0.005$) del área nuclear (figura R81).

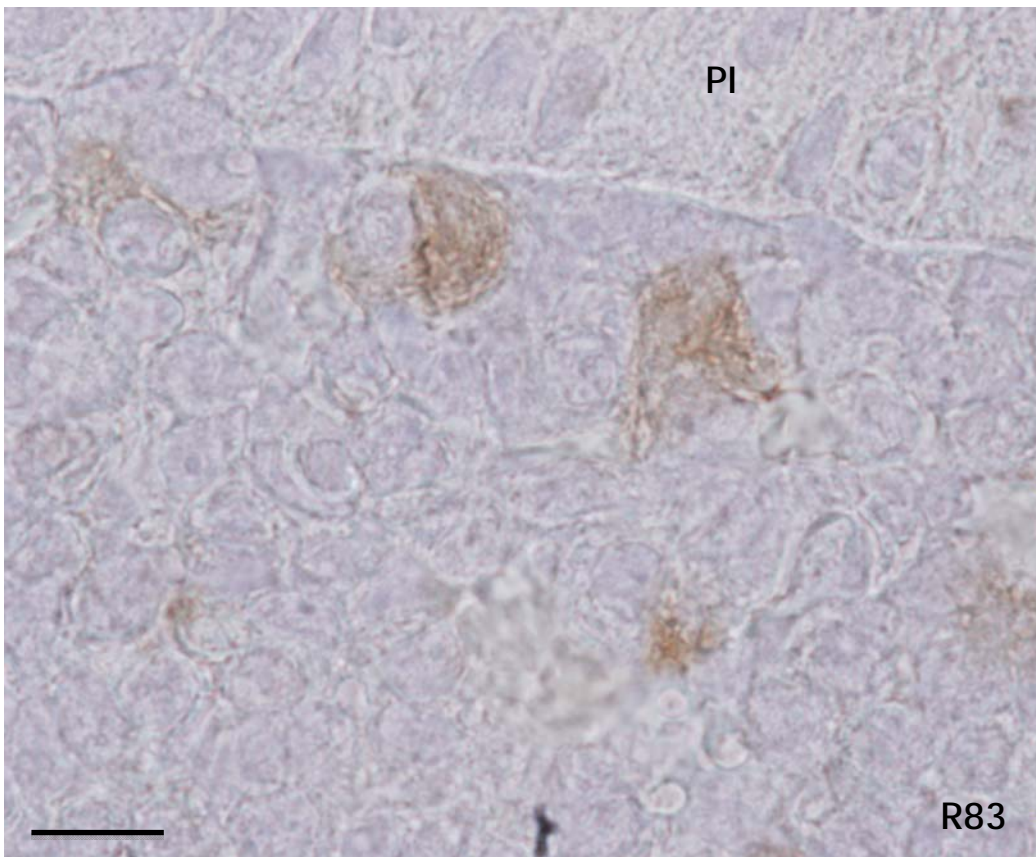


A grades aumentos se aprecia claramente que las células positivas a LH de las hembras wild type eran pequeñas, con un citoplasma muy poco reactivo, casi velado, núcleos pequeños y ovalados y un citoplasma con una reacción débil e irregular (figuras R82 y R83).

Figura R82: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en una wild type. Barra x20

Figura R83: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en una wild type. Barra x25

PI: Pars Intermedia



En las hembras knock out las células positivas a LH presentaban distintos patrones de intensidad de reacción de unos animales a otros (figuras R84 y R85), pero en todos los casos las células fueron más abundantes y grandes que en las hembras wild type.

Su morfología fue irregular y sus núcleos ovalados y generalmente polarizados.

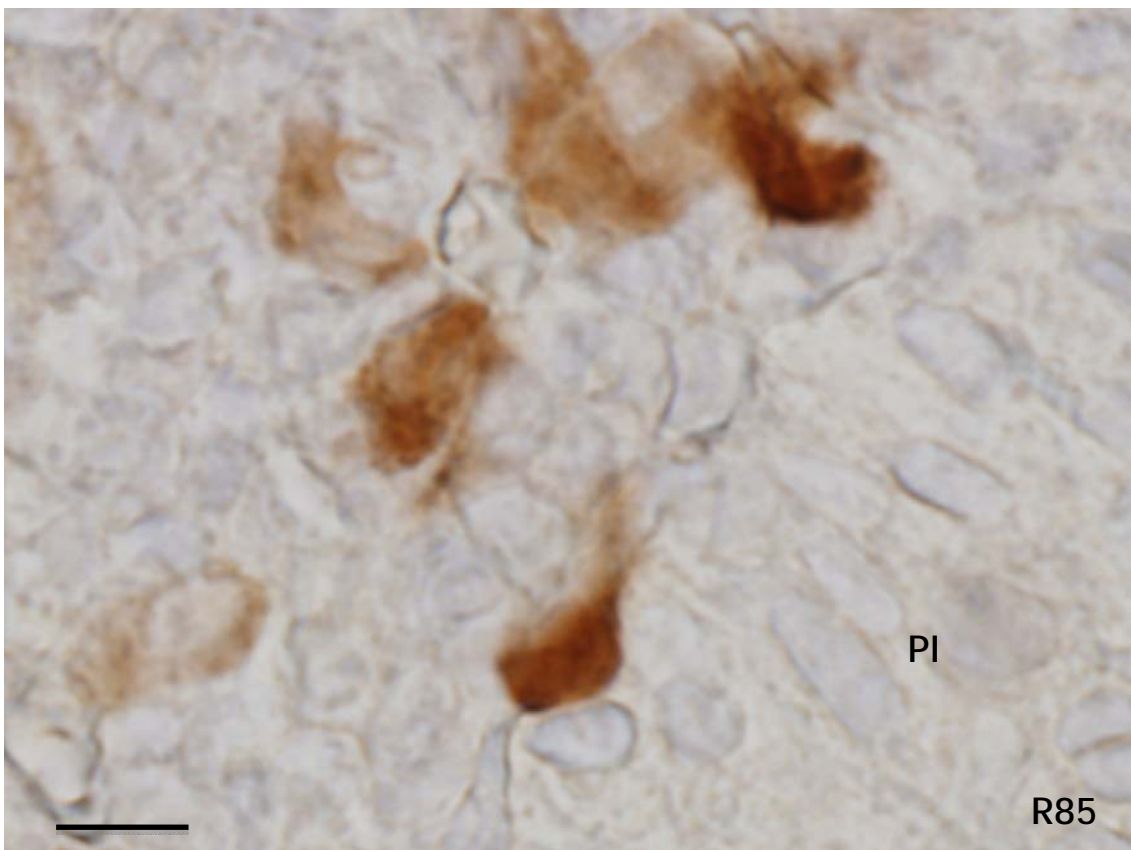
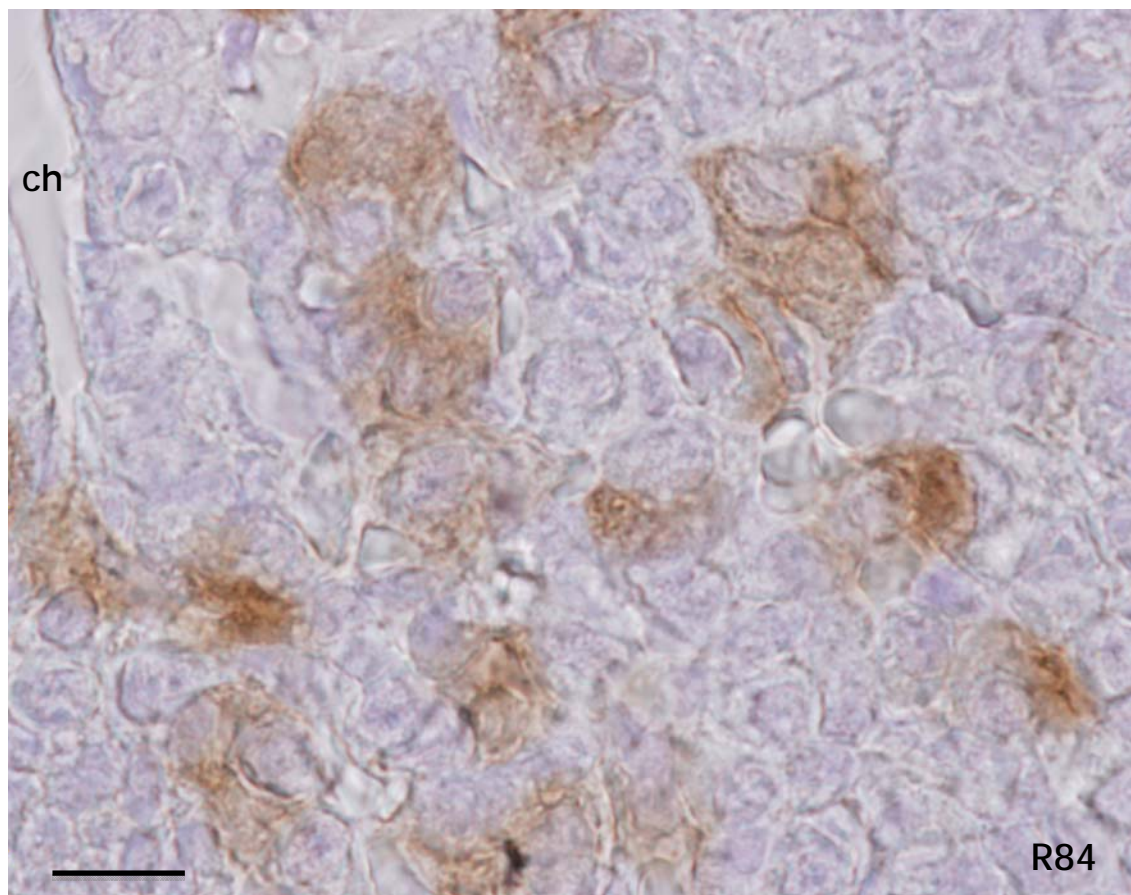
El citoplasma aparecía homogéneamente reactivo. Las células poco reactivas tenían un aspecto granular muy fino que afectaba a todo el citoplasma (figura R84).

Las células con intensidad de reacción intermedia en las que se apreció un aspecto granular grueso (flecha en figura R85).

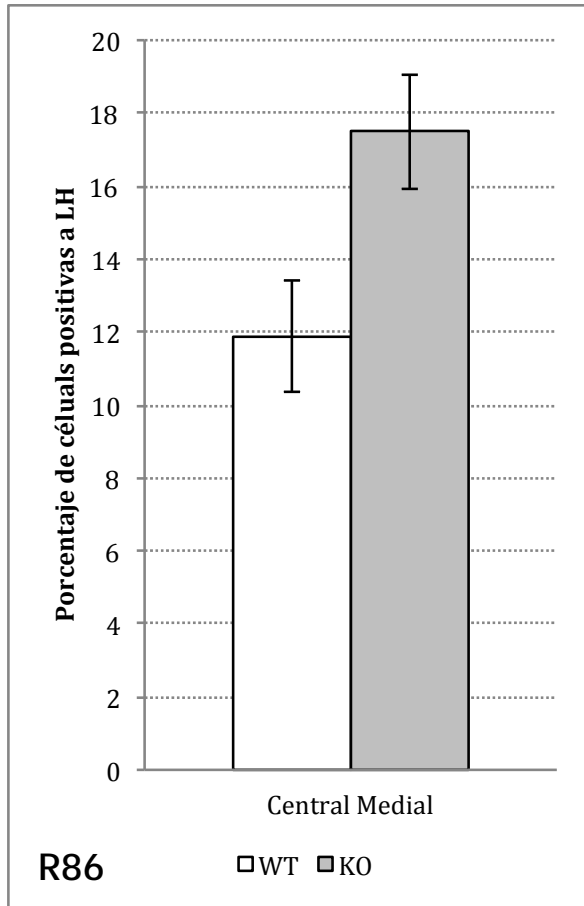
Las células fuertemente reactivas presentaban un citoplasma grumoso que dificultaba ver el núcleo de la célula, semejante a como ocurre en otras regiones de la hipófisis en estos animales.

Figura R84: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en una knock out. Barra x25

Figura R85: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en una knock out. Barra x25
ch: caverna hipofisaria, PI: Pars Intermedia



Región Central Medial (8m).



La región central de la hipófisis ocupa un gran volumen dentro de la glándula por lo que hemos optado por diferenciar entre la zona lateral y la medial de la misma.

Esta elección se hizo porque, de visu, parecían existir diferencias entre dichas zonas, más claras y fáciles de delimitar que si se hubiera optado por diferenciar zona dorsal de zona ventral.

La gráfica R86 muestra las diferencias observadas en los porcentajes de células positivas a LH en las hembras wild type y en las knock out.

Claramente las hembras knock out presentaron más células positivas a LH que las wild type ($p < 0.05$).

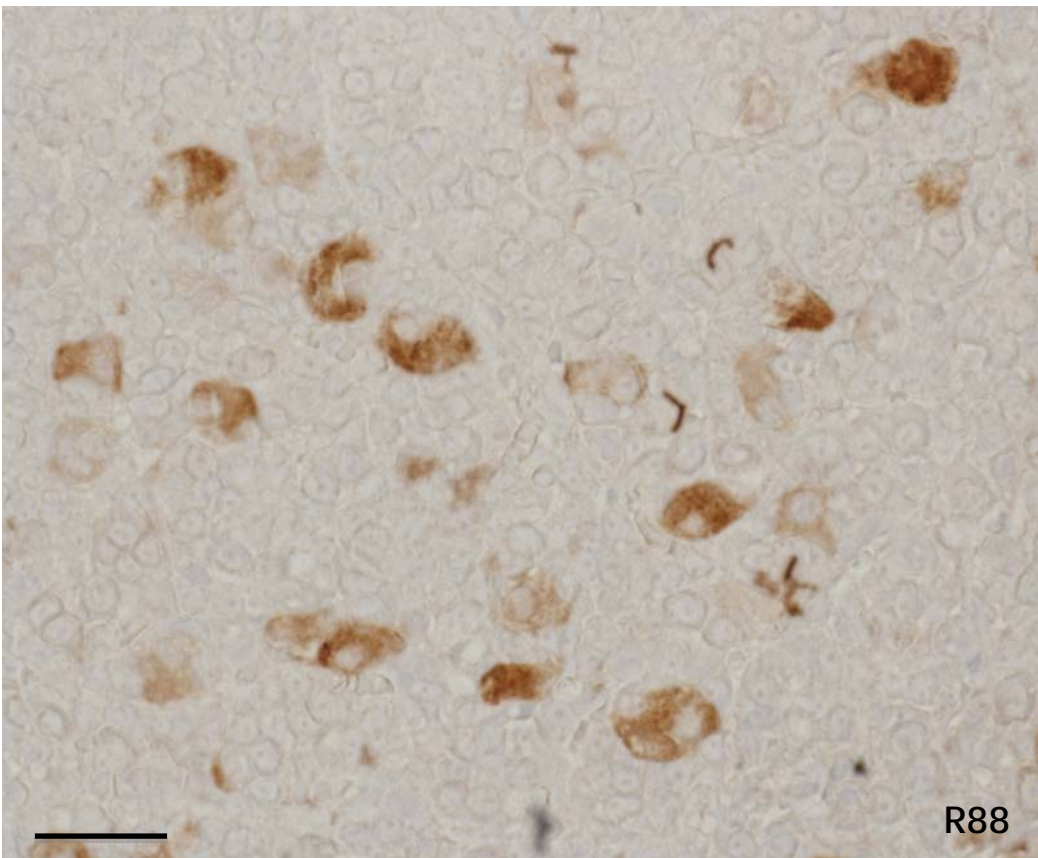
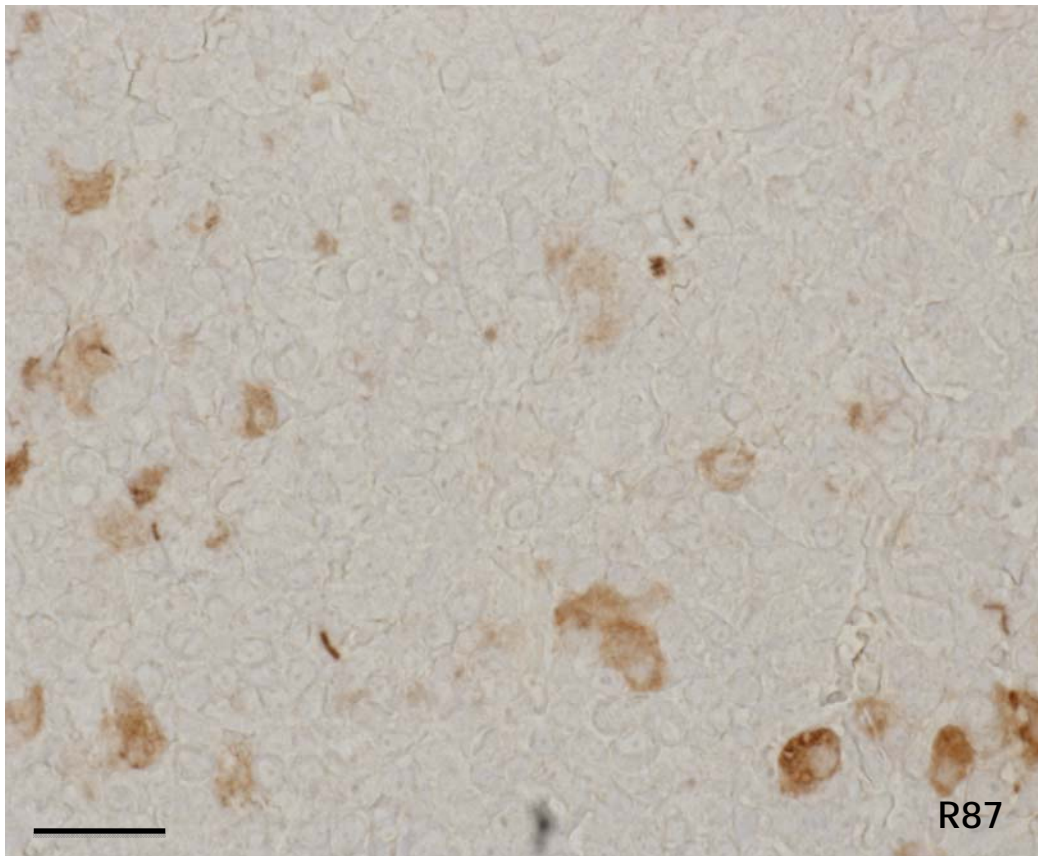
La distribución de las células positivas a LH en la región central medial no fue uniforme, variando de unos animales a otros (figuras R87 y R88) y variando de rostral a caudal dentro del mismo animal.

A pesar de ello, se constató que las células aparecían aisladas aunque cercanas unas a otras y, en muchas ocasiones, abrazando a células no reactivas.

Como es habitual en otras regiones de la hipófisis, se diferenciaron bien dos patrones de marcaje: células muy reactivas y células débilmente reactivas.

Figura R87: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50

Figura R89: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50

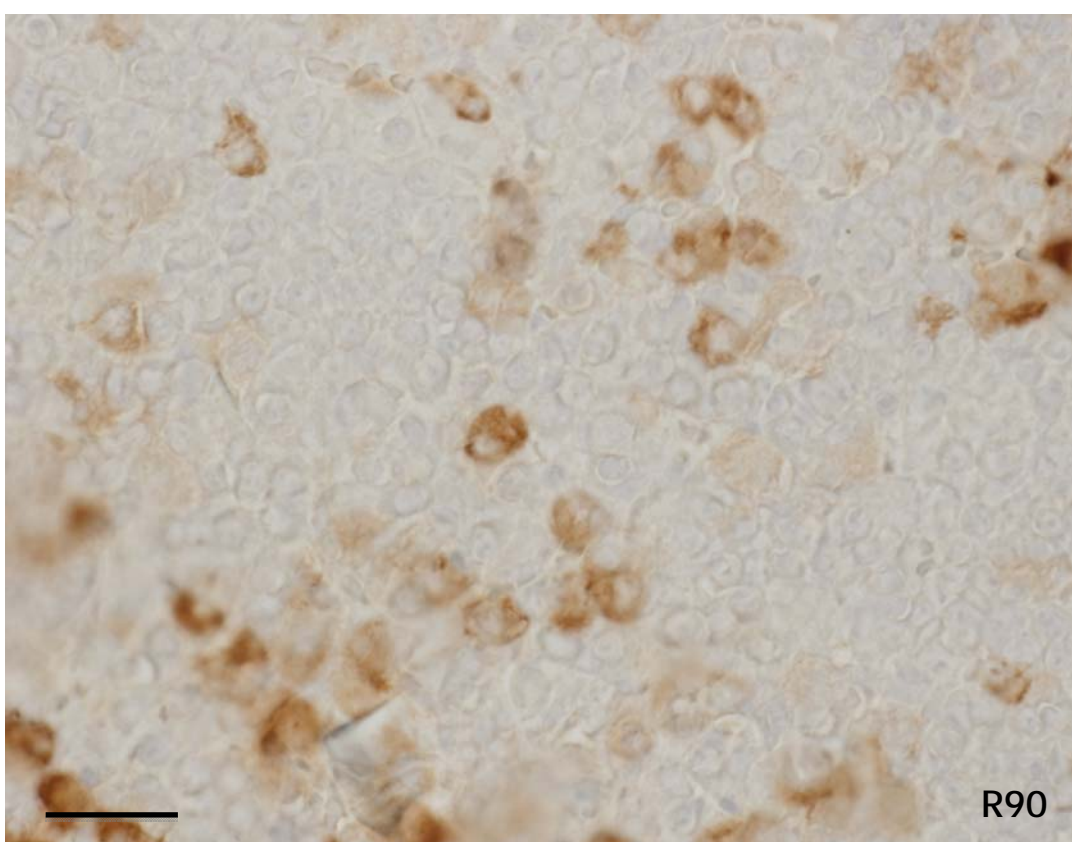
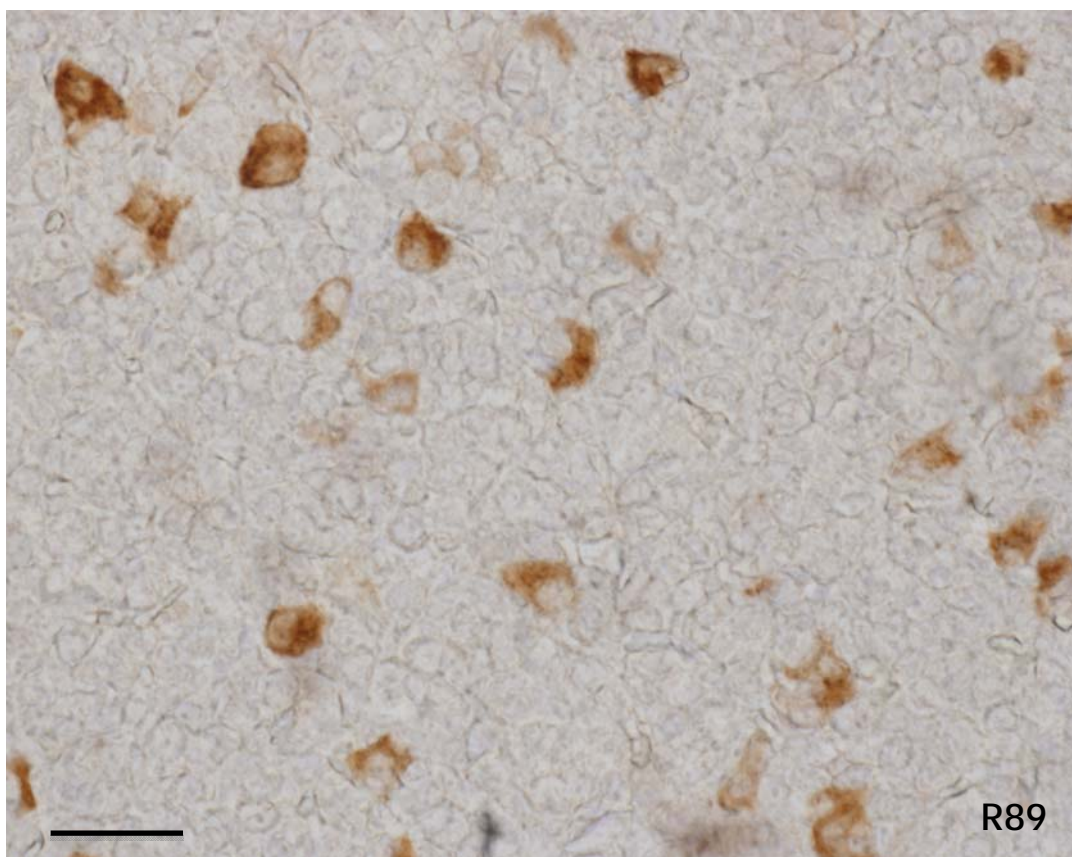


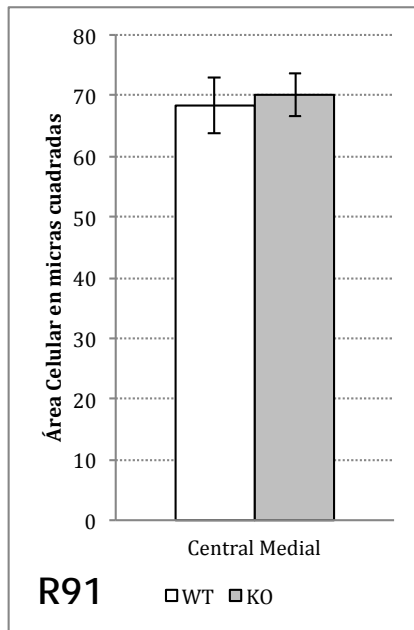
En las hembras knock out, la distribución celular fue semejante a la observada en las hembras wild type (figura R89), si bien la intensidad de reacción fue algo más intensa.

No obstante, también fue frecuente encontrar células positivas a LH agrupadas formando pequeños claustros, la mayor parte de las veces incompletos, que abrazaban a células no reactivas (figura R90).

Figura R89: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

Figura R90: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50





En la región central medial de la hipófisis no se apreciaron diferencias significativas en el área celular entre las hembras wild type y las knock out (figura R91).

No ocurría así con el área nuclear (figura R92) que fue significativamente mayor en la knock out ($p < 0.05$).

Las células positivas a LH en las hebras wild type (figuras R93 y R94) presentaron una morfología variable, unas veces fueron células ovaladas de núcleo más o menos central, otras veces fueron irregulares con prolongaciones citoplásmicas finas que abrazaban a células no reactivas o, con menos frecuencia, poligonales.

Los núcleos redondos u ovals aparecían ligeramente desplazados del centro, pero no polarizados. Muchas veces con nucleolo evidente.

Los citoplasmas presentaron una granulación fina, con imágenes cisternales.

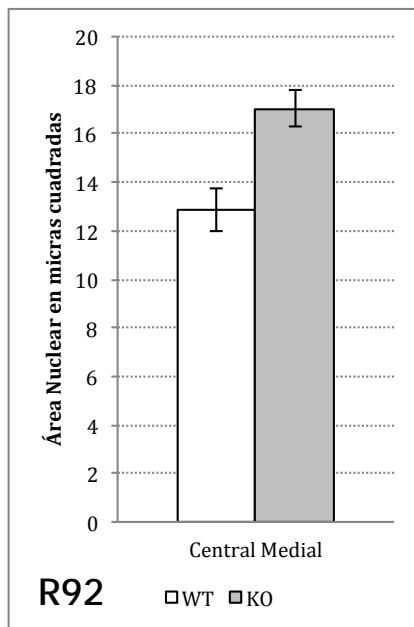
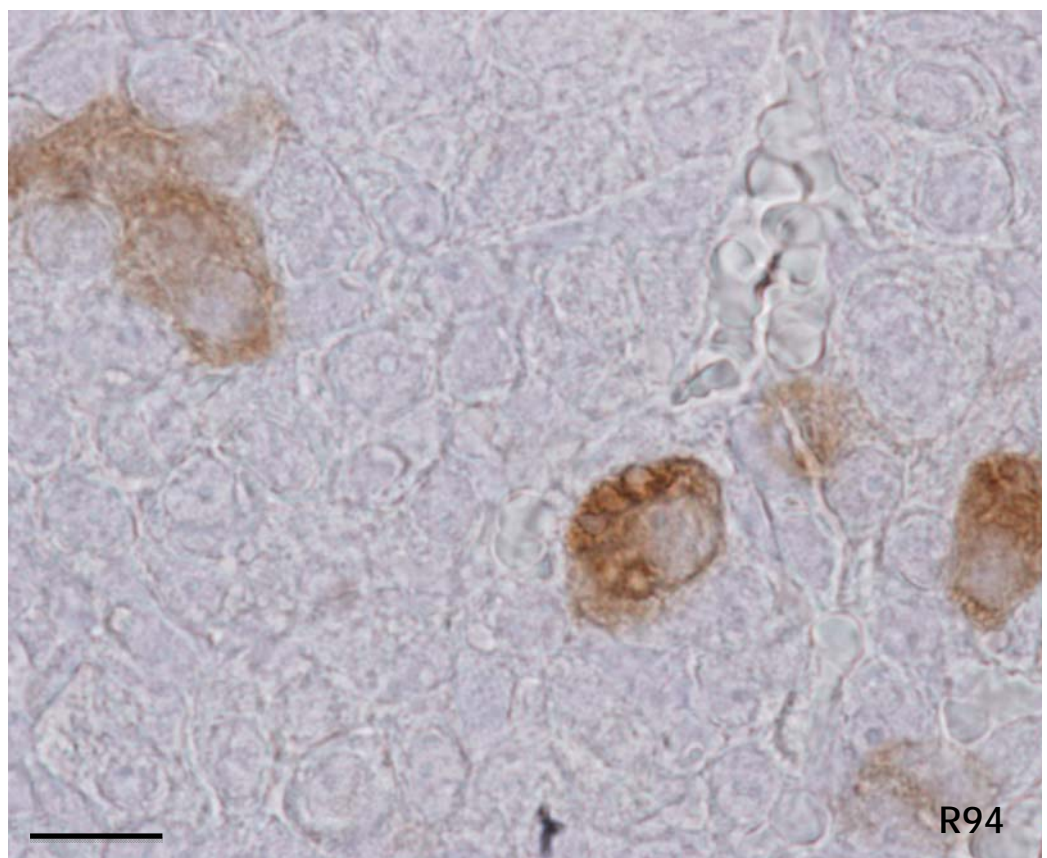
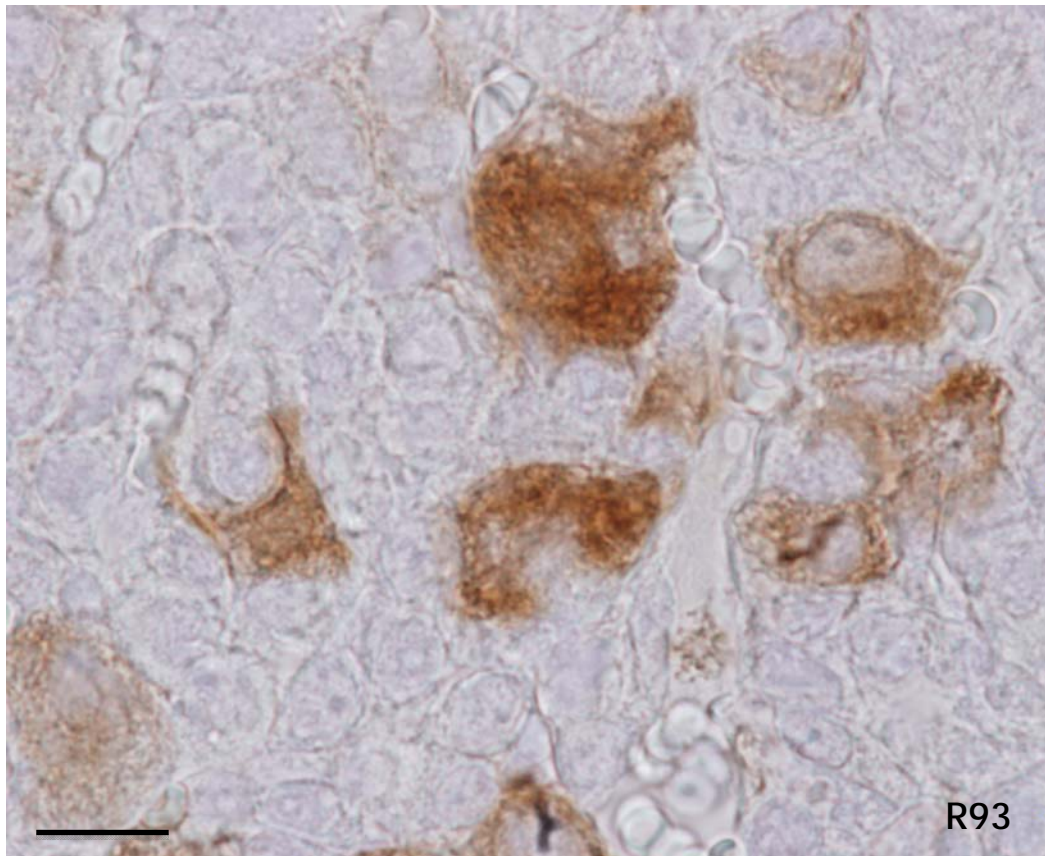


Figura R93: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25

Figura R94: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25



Con respecto a las hembras wild type, las células positivas a LH de la región central medial de la hipófisis de las hembras knock out (figuras R95 y R96) presentaron tres diferencias notables.

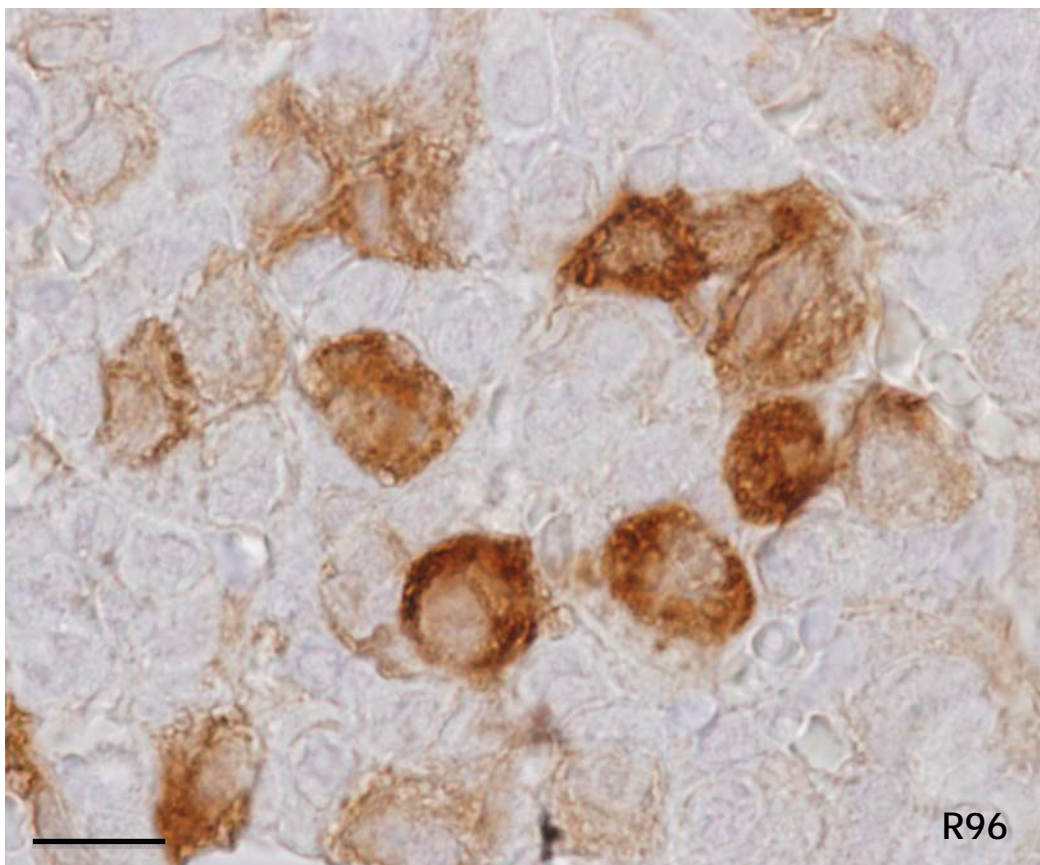
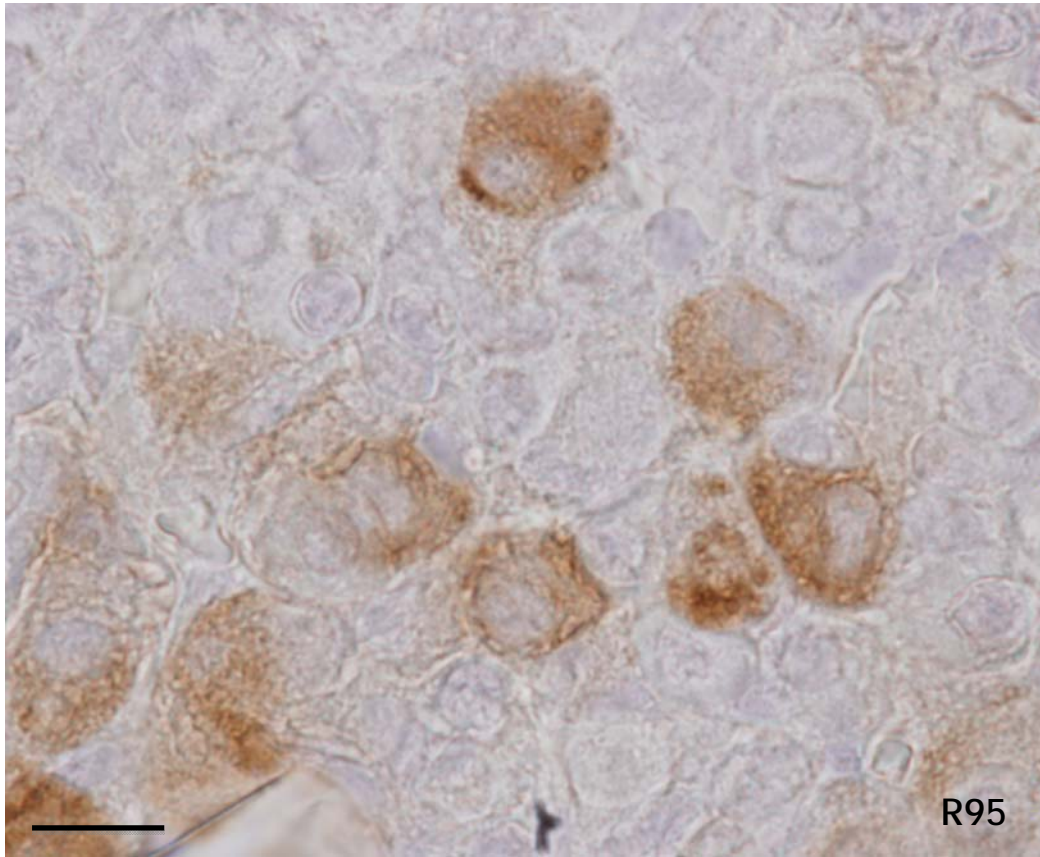
En primer lugar, la morfología celular fue más homogénea de unas células a otras, predominando las formas ovaladas y poligonales.

Por otro lado, los núcleos eran grandes hipocromáticos y casi siempre polarizados.

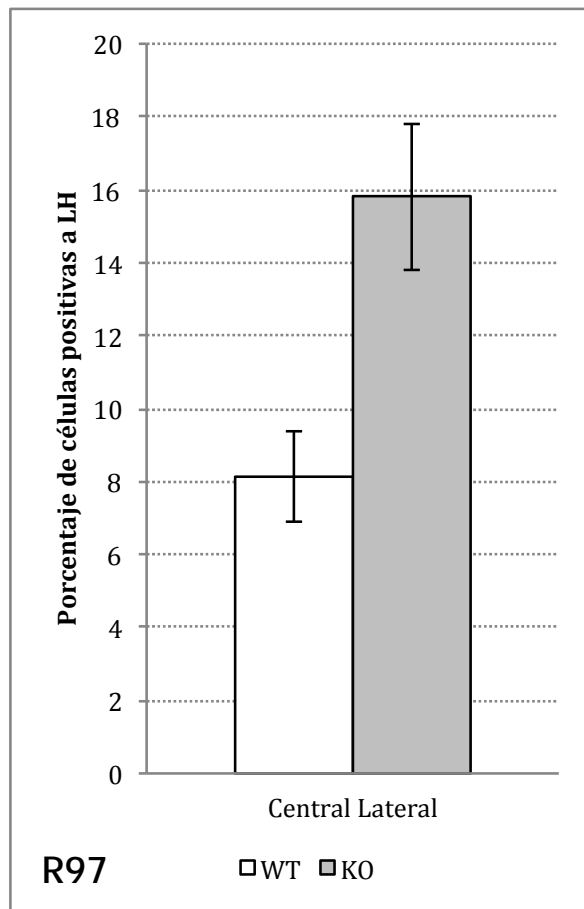
Por último, las células aparecieron agrupadas formando claustros muchas veces incompletos, pero a veces casi circulares de células positivas que englobaban en su interior a células no reactivas.

Figura R95: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25

Figura R96: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25



Región Central Lateral (8l).

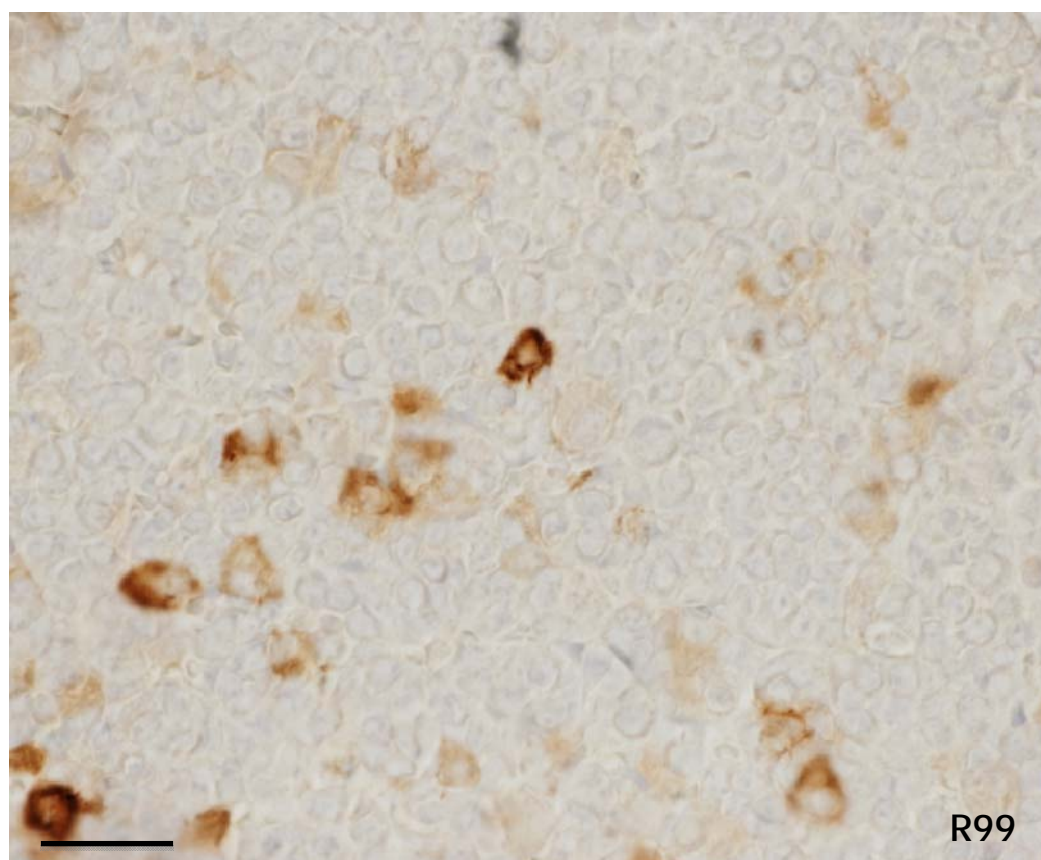
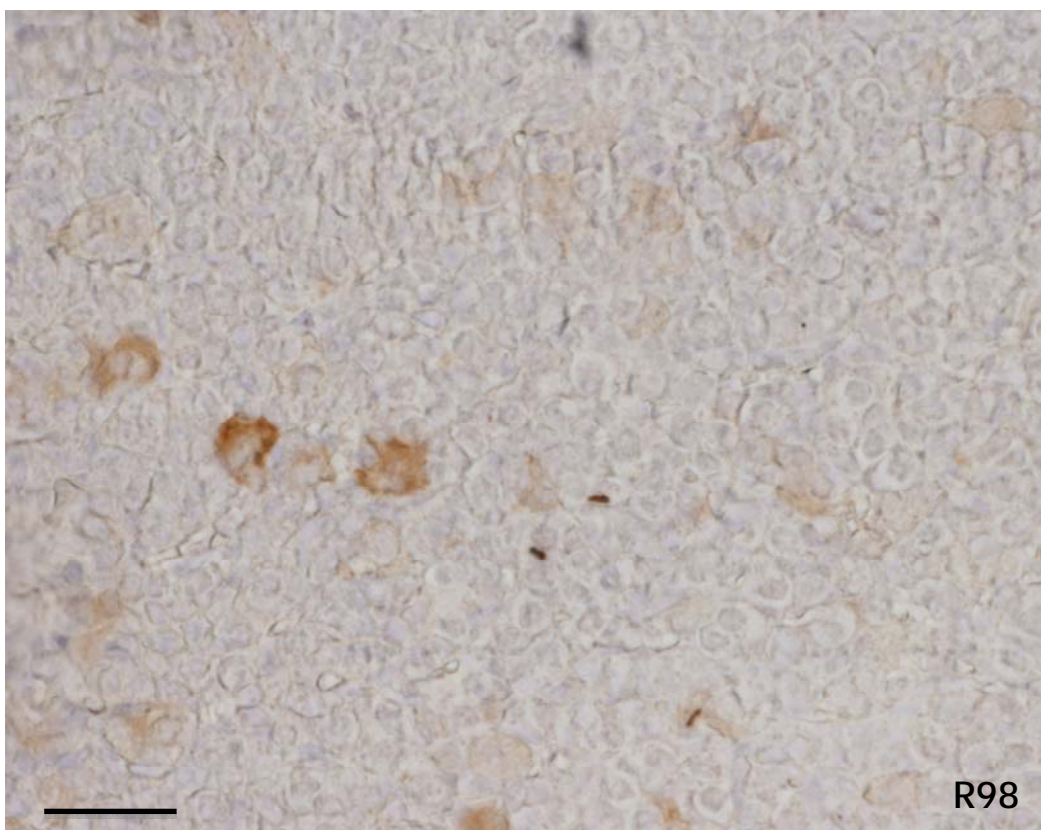


Tanto la gráfica de la figura R97 como las micrografías R98 a R101 son lo suficientemente demostrativas de cómo las células positivas a LH en la región central lateral de la hipófisis fueron mucho más numerosas en las hembras knock out que en la wild type ($p < 0.005$).

La células positivas a LH de esta región en las hembras wild type aparecieron aisladas y diseminadas por la región, la mayoría de ellas con un citoplasma muy velado por su baja intensidad de tinción (figuras R98 y R99).

Figura R98: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50

Figura R99: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50



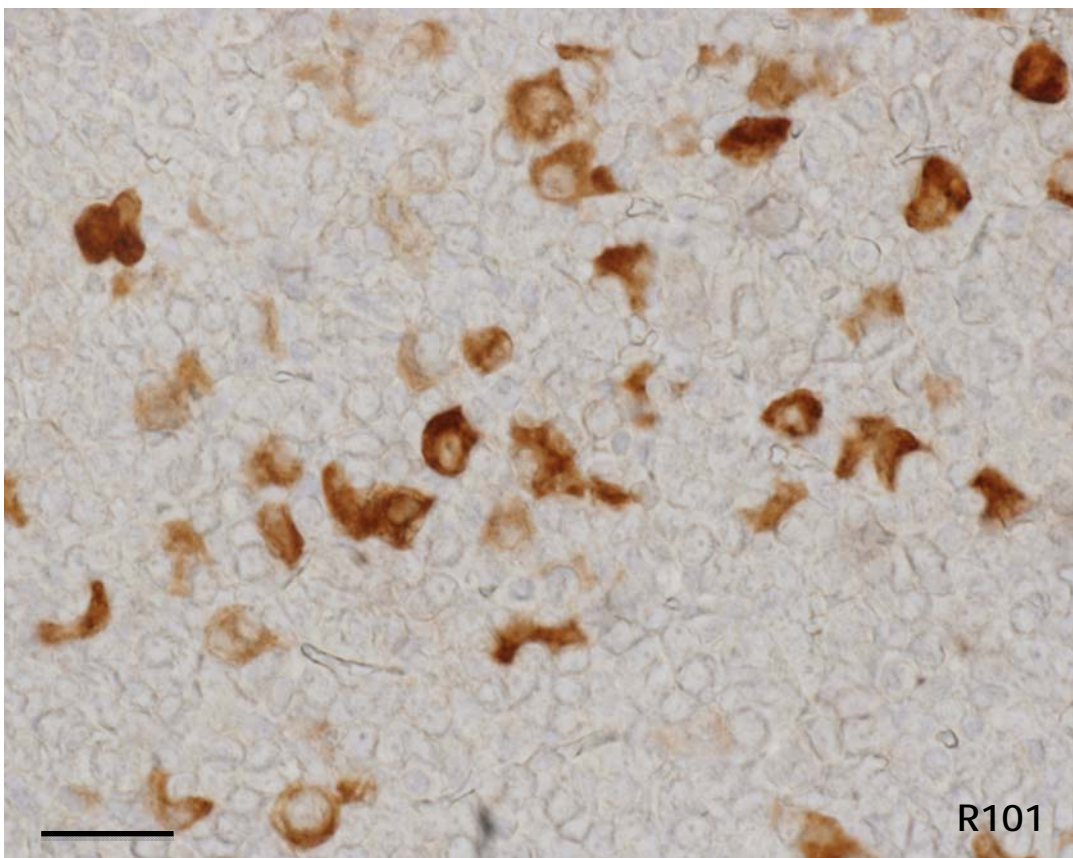
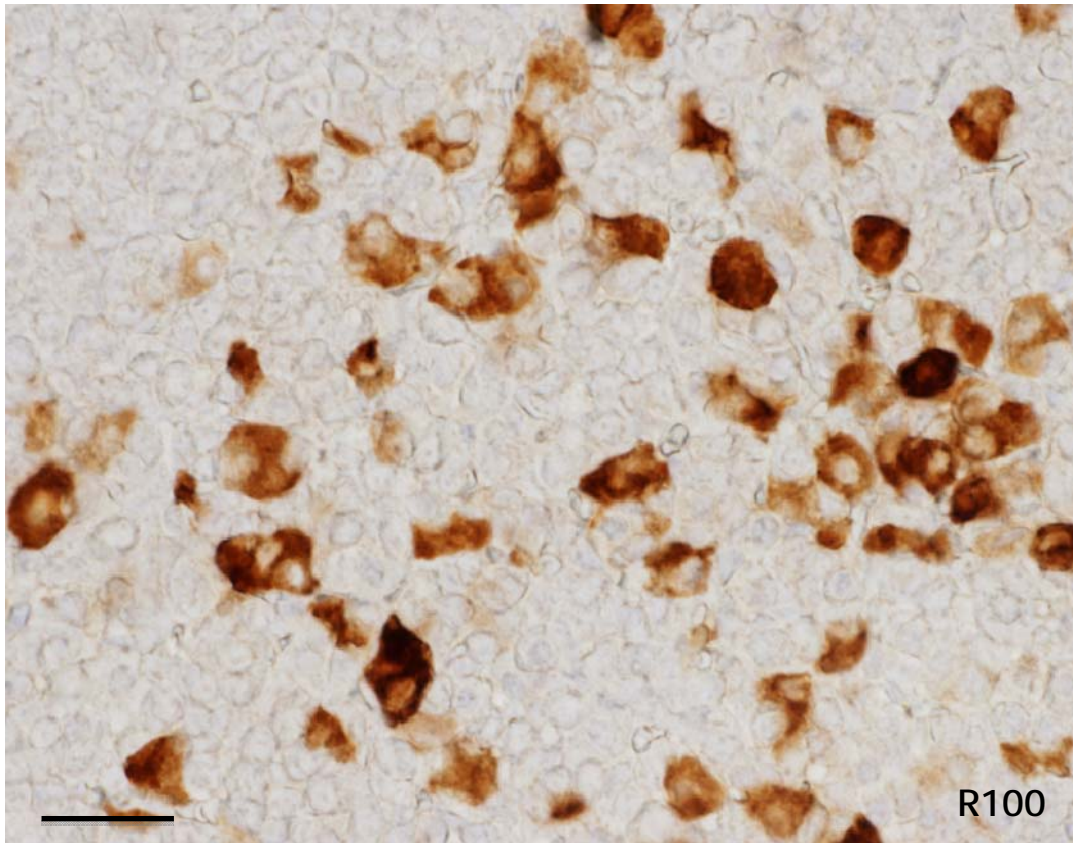
La región central lateral en los animales knock out apareció con muchas células positivas (figuras R100 y R101) cuya intensidad de reacción fue mucho mayor que la observada en los wild type.

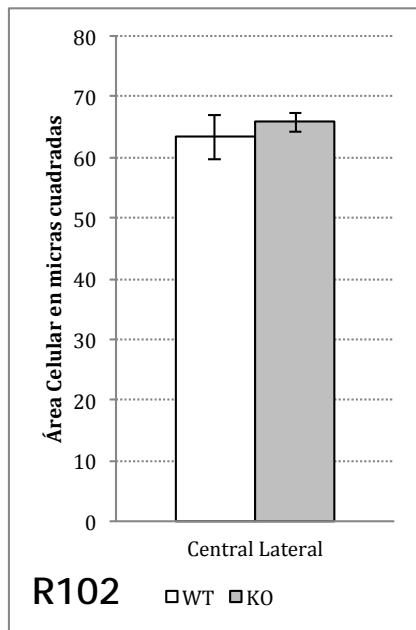
En ocasiones se observaron islotes celulares formados casi exclusivamente por células positivas a LH (figura R100).

Los pequeños grupos de 2 ó 3 células positivas también fueron muy frecuentes.

Figura R100: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

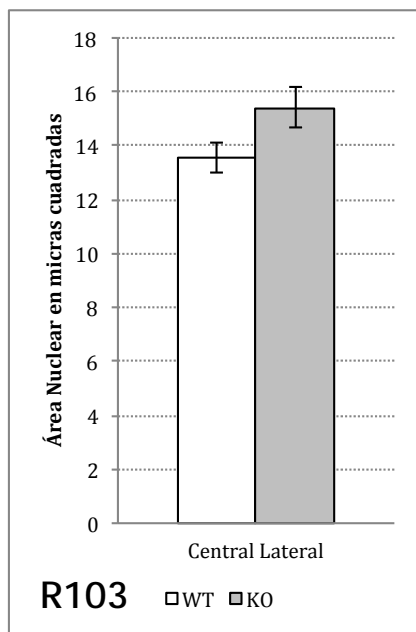
Figura R101: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50





Las diferencias en el porcentaje de células reactivas no se reflejaron en el tamaño de las células.

Tal y como se muestra en las gráficas de las figuras R102 y R103, no se hallaron diferencias significativas en el tamaño de las células positivas a LH o en de sus núcleos entre las hembras wild type y las knock out.



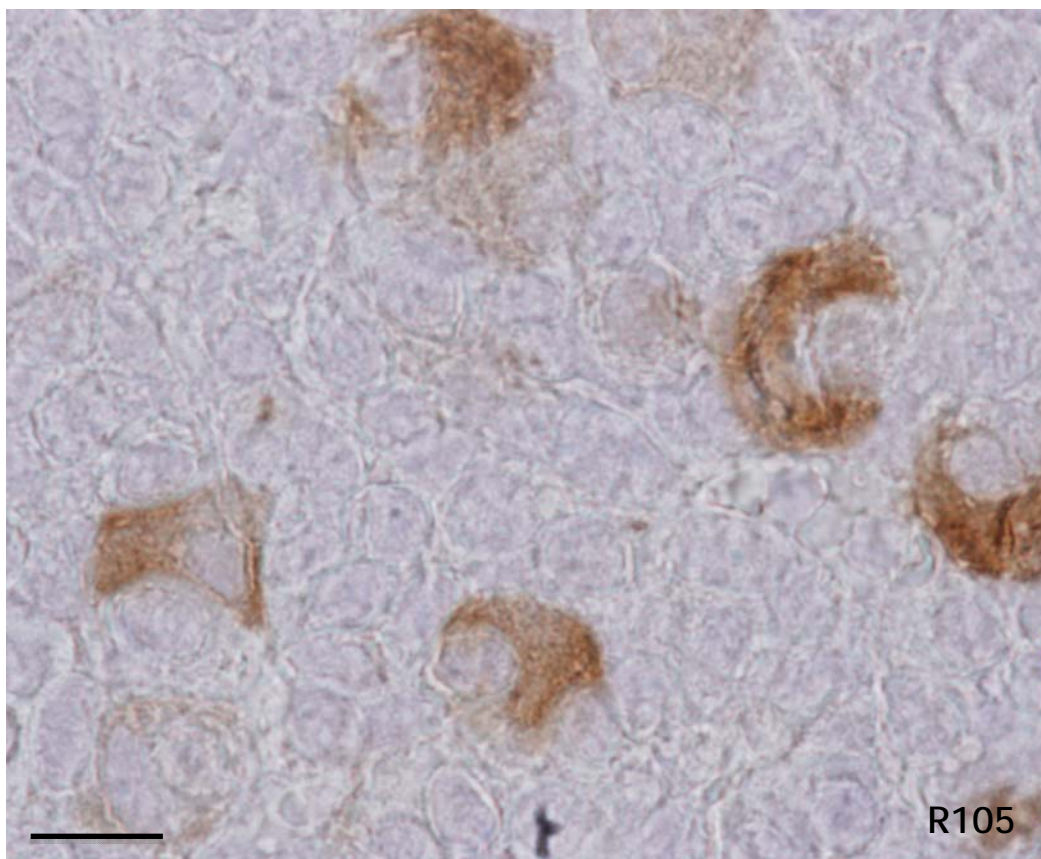
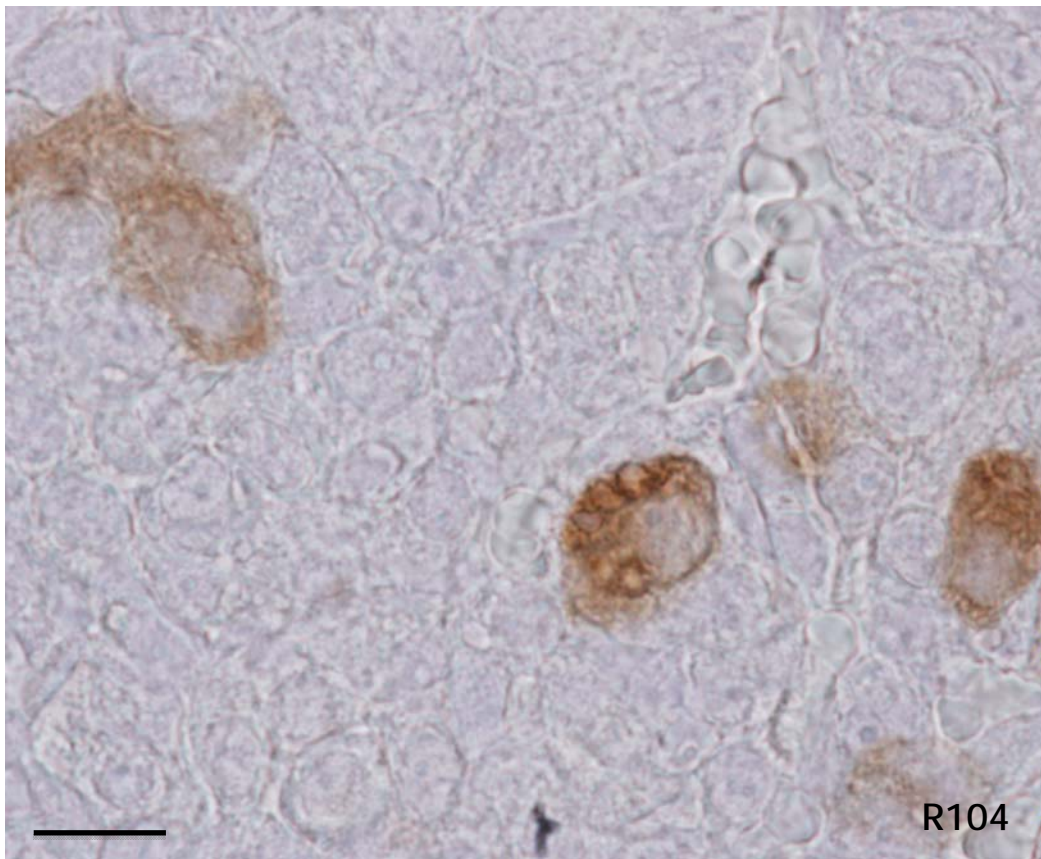
Las células positivas en las hembras wild type (figuras R104 y R105) fueron ovaladas o irregulares, lo que otros autores han denominado células en copa, ya que presentan una concavidad lateral que está ocupada por una célula negativa a LH.

Los núcleos eran excéntricos e hipocromáticos.

Los citoplasmas presentaban un aspecto granular muy fino, con poca intensidad en la reacción inmunocitoquímica y, a veces, se podían observar imágenes cisternales.

Figura R104: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25

Figura R105: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25



Las hembras knock out presentaron células positivas a LH, en esta región de la hipófisis (figuras R106 y R107), manifiestamente diferentes a las observadas en las wild type.

Las células eran irregulares y muy variables en su forma, desde ovaladas hasta casi estrelladas.

Aparecieron intensamente reactivas, las células de positividad más débil eran casi tan reactivas como las de positividad más alta en las wild type.

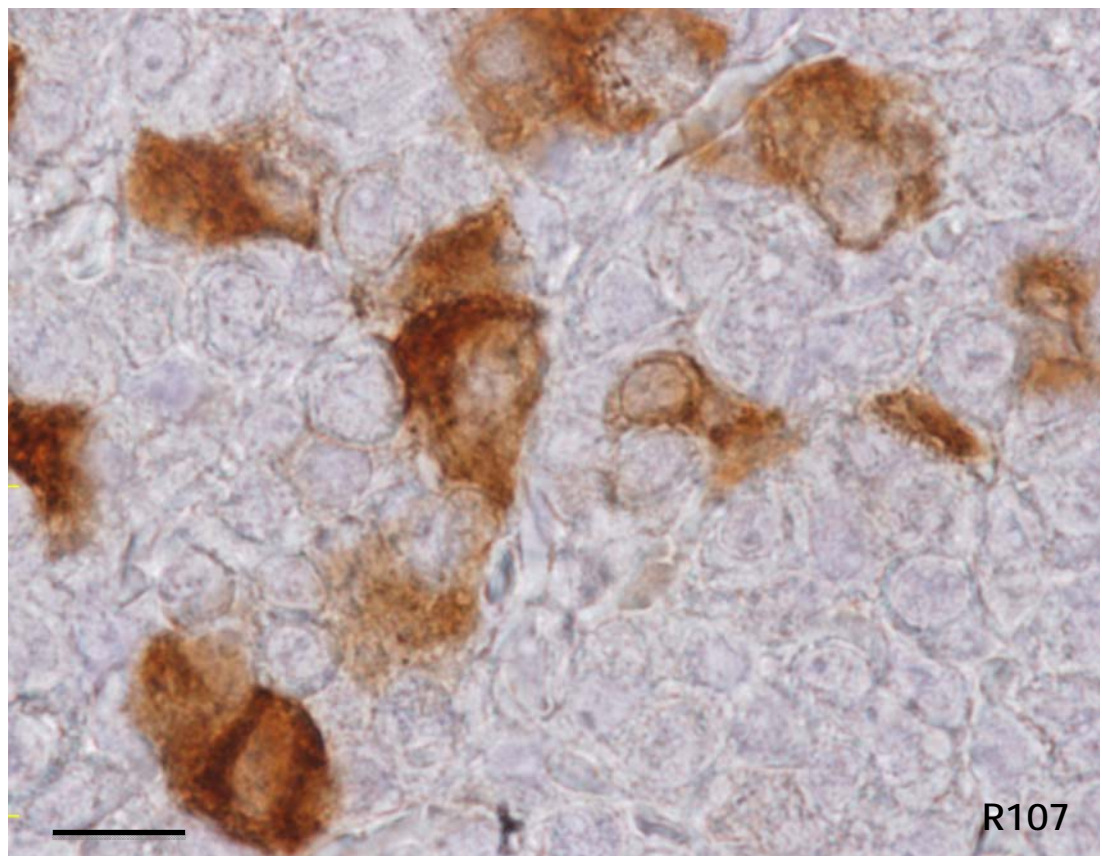
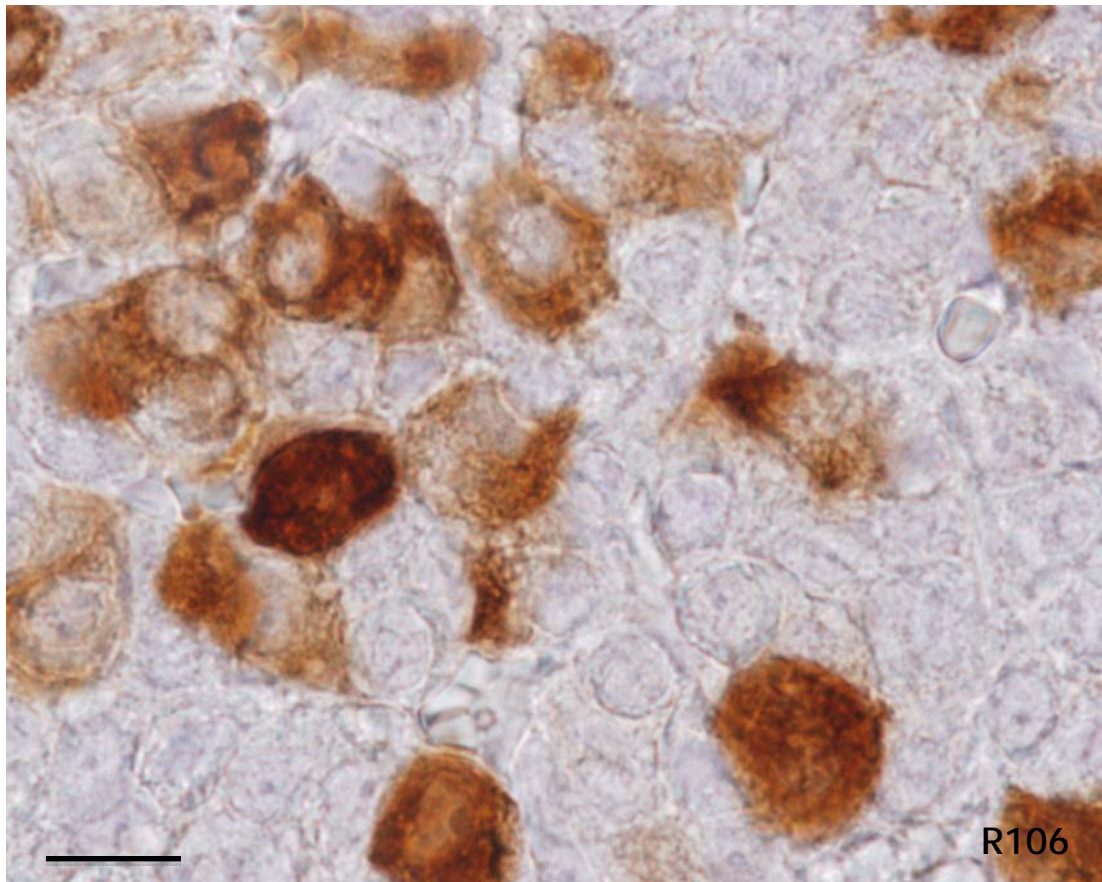
Los núcleos generalmente redondeados se situaban de forma muy variable dentro de la célula.

Las células rara vez aparecían aisladas, siendo lo más frecuente formar pequeños grupos celulares o pequeños islotes.

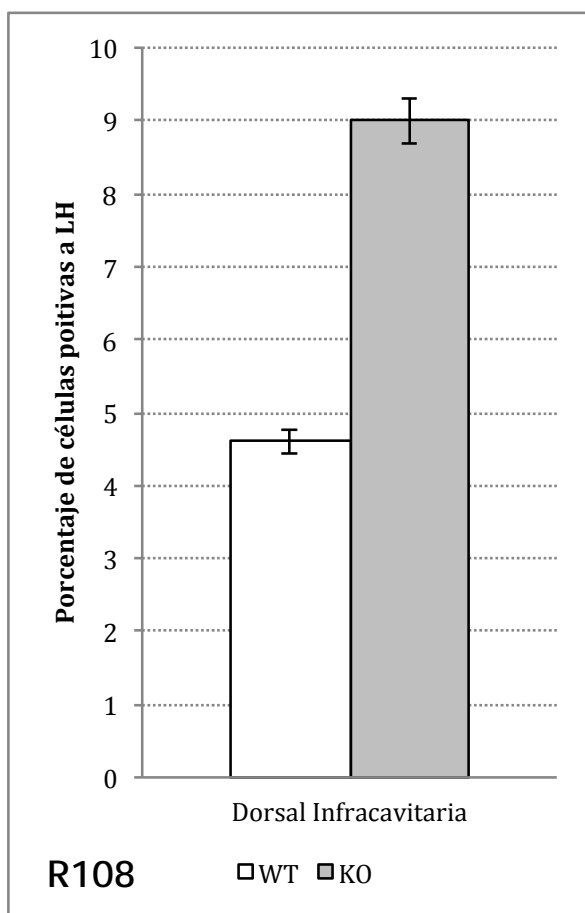
Los citoplasmas tenían aspecto granular, pero no homogéneo, con mayor presencia de los granos en unas partes del citoplasma más que en otras.

Figura R106: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25

Figura R107: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25



Región dorsal infracavitaria (7).



Al igual que ocurría en las regiones centrales, en la región dorsal infracavitaria, que sería la región más dorsal de la parte central de la hipófisis, el porcentaje de células positivas en las hembras knock out fue significativamente mayor ($p < 0.005$) que en las hembras wild type (figura R108).

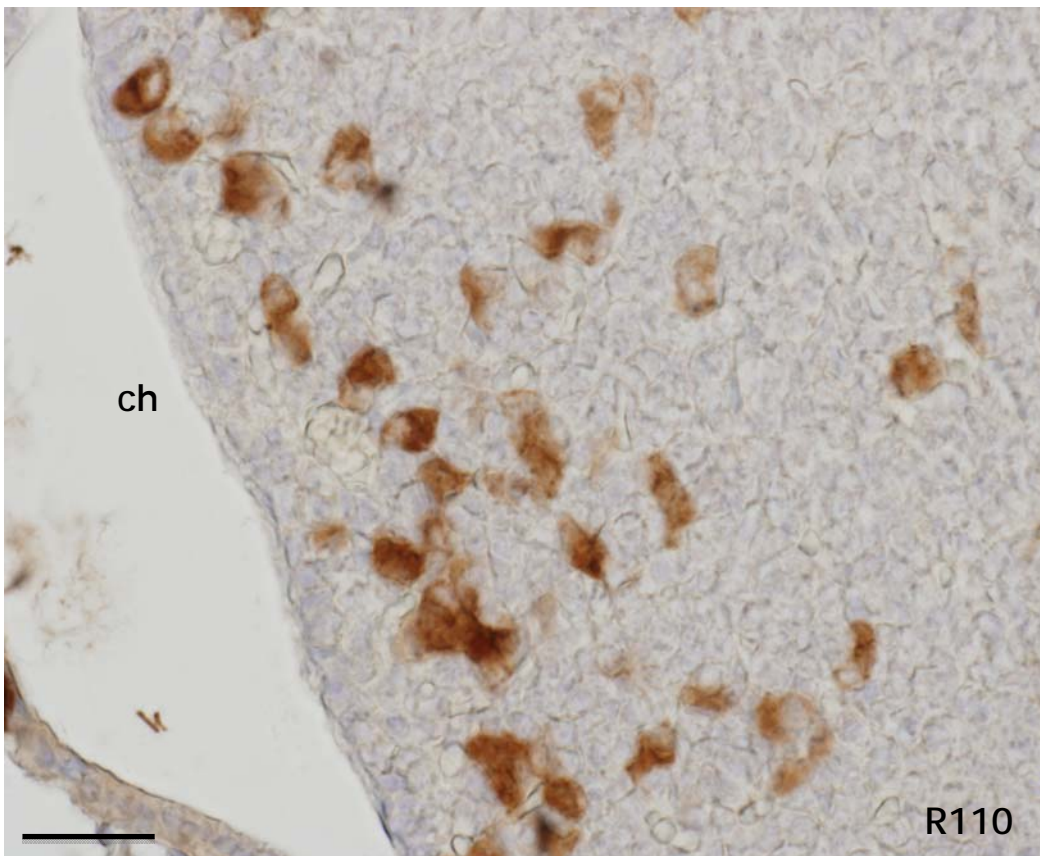
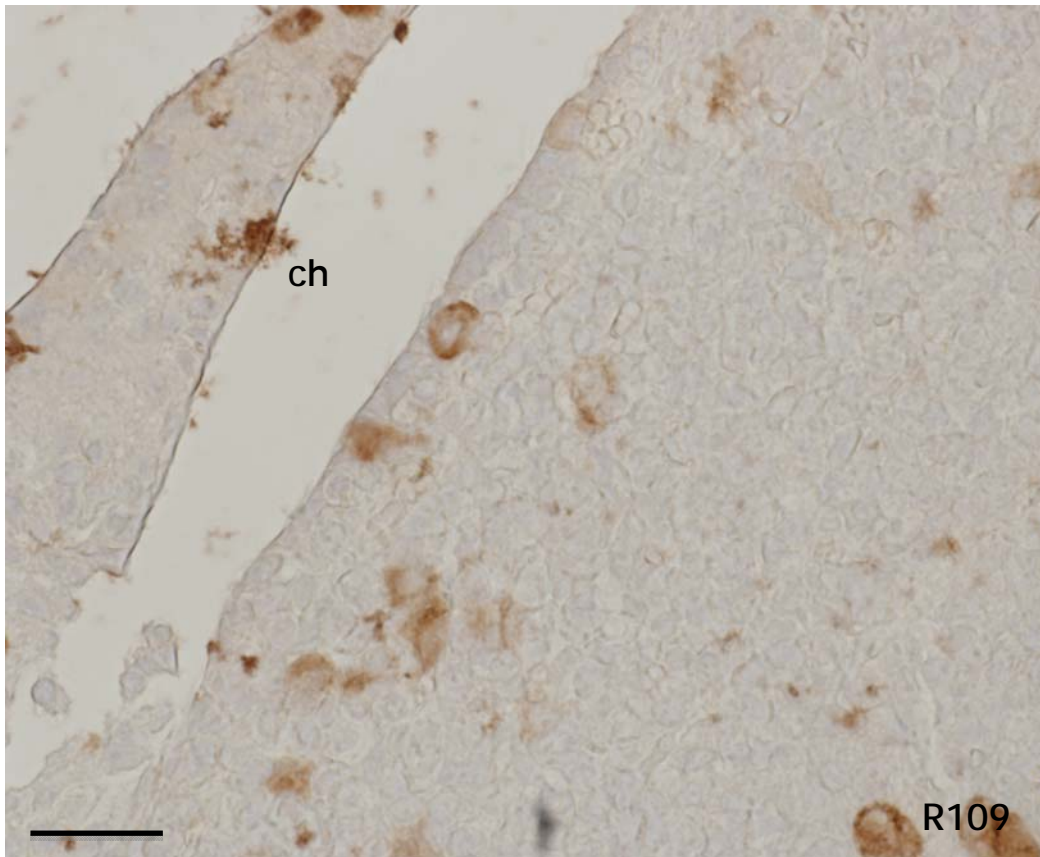
La presencia de células positivas a LH en esta región en las hembras wild type presentó grandes fluctuaciones de unos animales a otros (figuras R109 y R110).

También la intensidad de reacción fue variable entre los distintos animales estudiados.

Aunque muchas células positivas a LH aparecieron aisladas, fue frecuente observar pequeños islotes de 4 ó 5 células esparcidos por esta región.

Figura R109: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50

Figura R110: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x50
ch: caverna hipofisaria

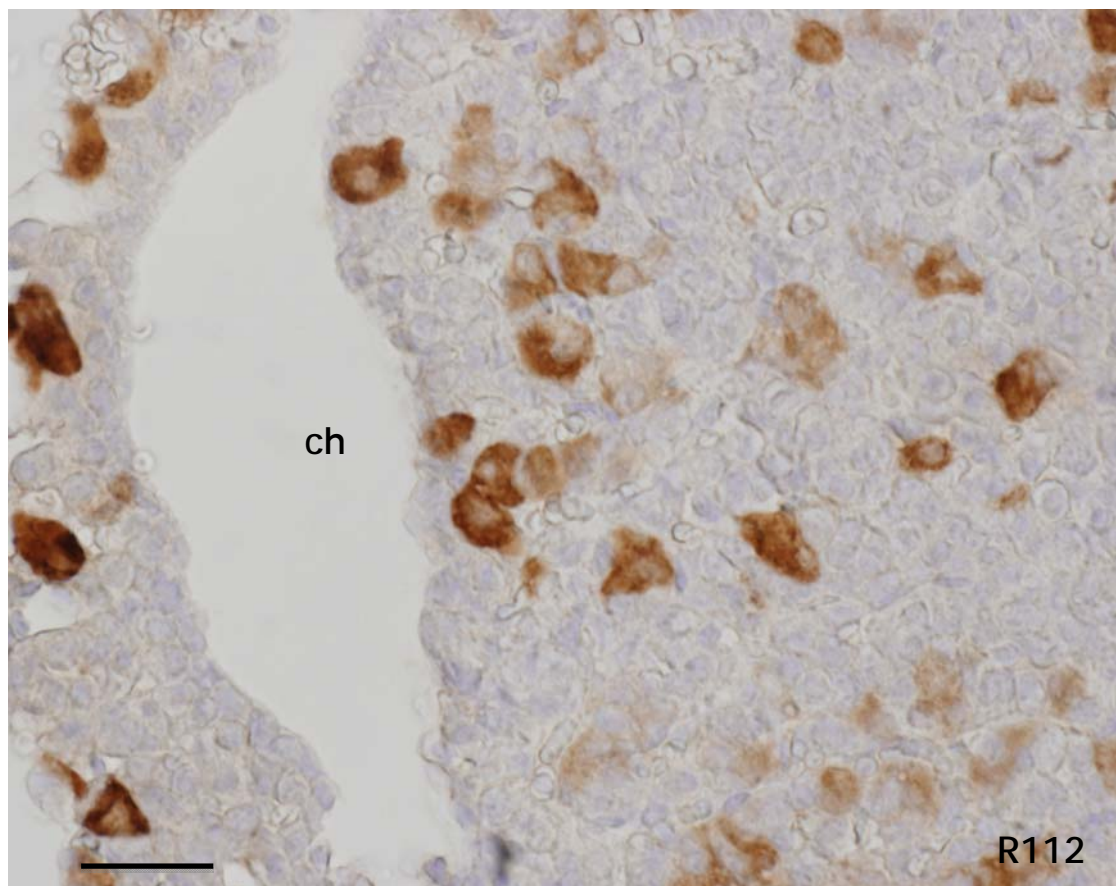
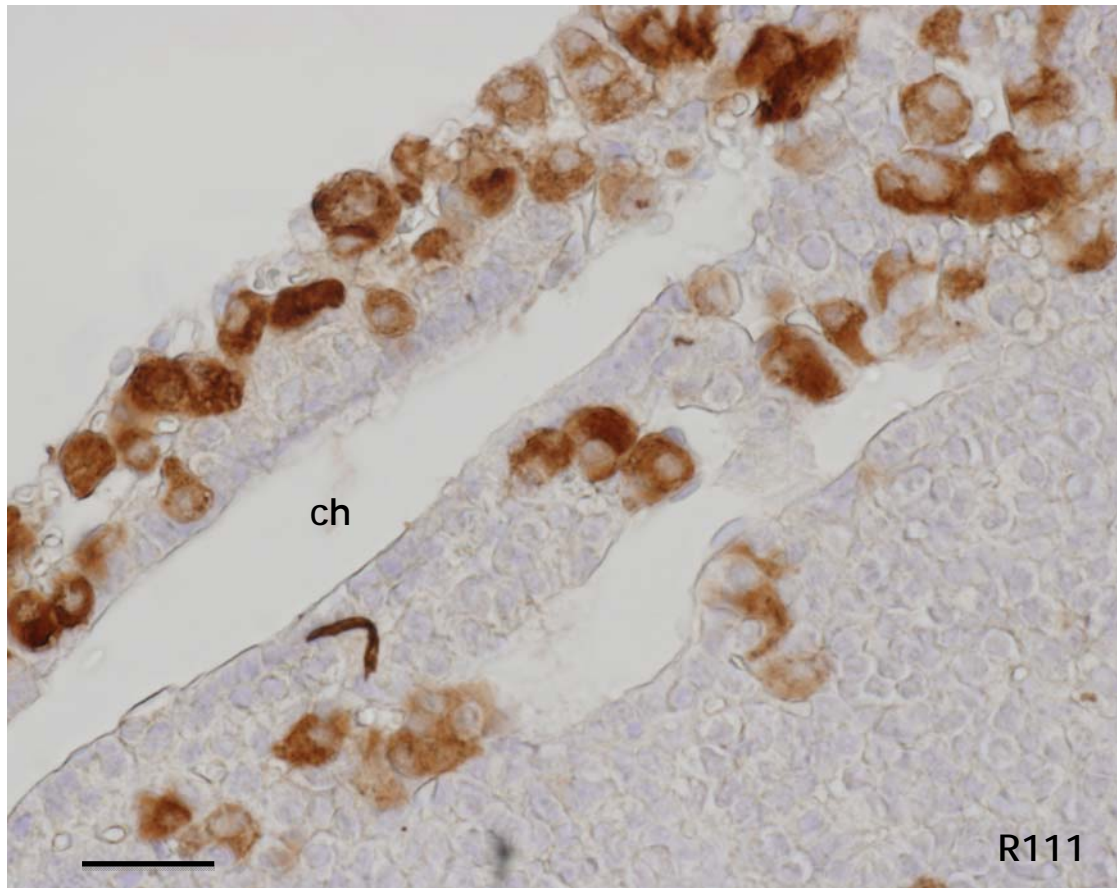


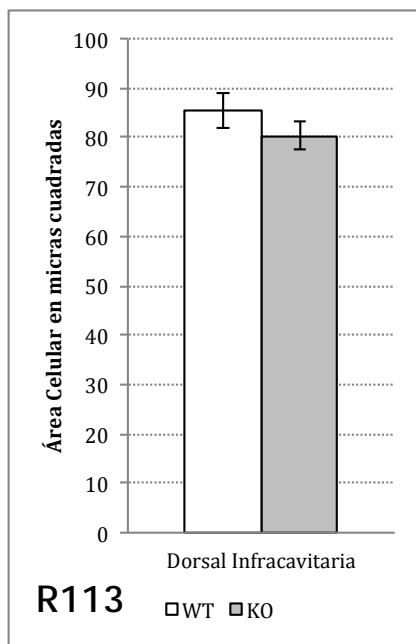
Las células positivas de esta región en las hembras knock out (figuras R11 y R112) fueron diferentes a las observadas en las hembras wild type.

En su morfología, intensidad de reacción, y agrupación en islotes o cordones, recuerdan mucho a las células observadas en la región dorsal tuberal.

Figura R111: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50

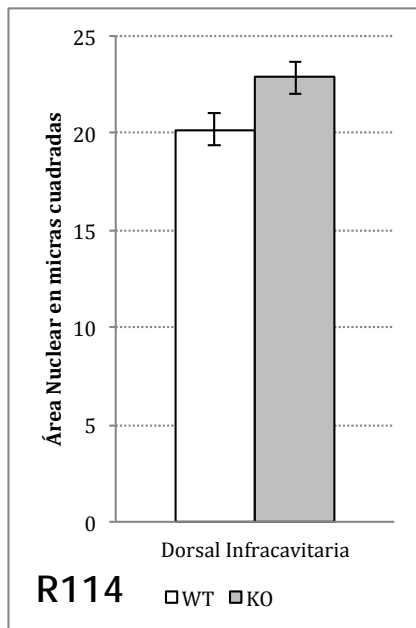
Figura R112: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x50
ch: caverna hipofisaria





En esta región de la hipófisis, al igual que ocurría en las regiones centrales, no se observaron diferencias significativas en el área celular (figura R113) o en el área nuclear (figura R114) entre las hembras wild type y las knock out.

Las células positivas a LH de esta región en las hembras wild type (figuras R115 y R116) en general eran bien reactivas, de forma triangular, rectangular o irregular.

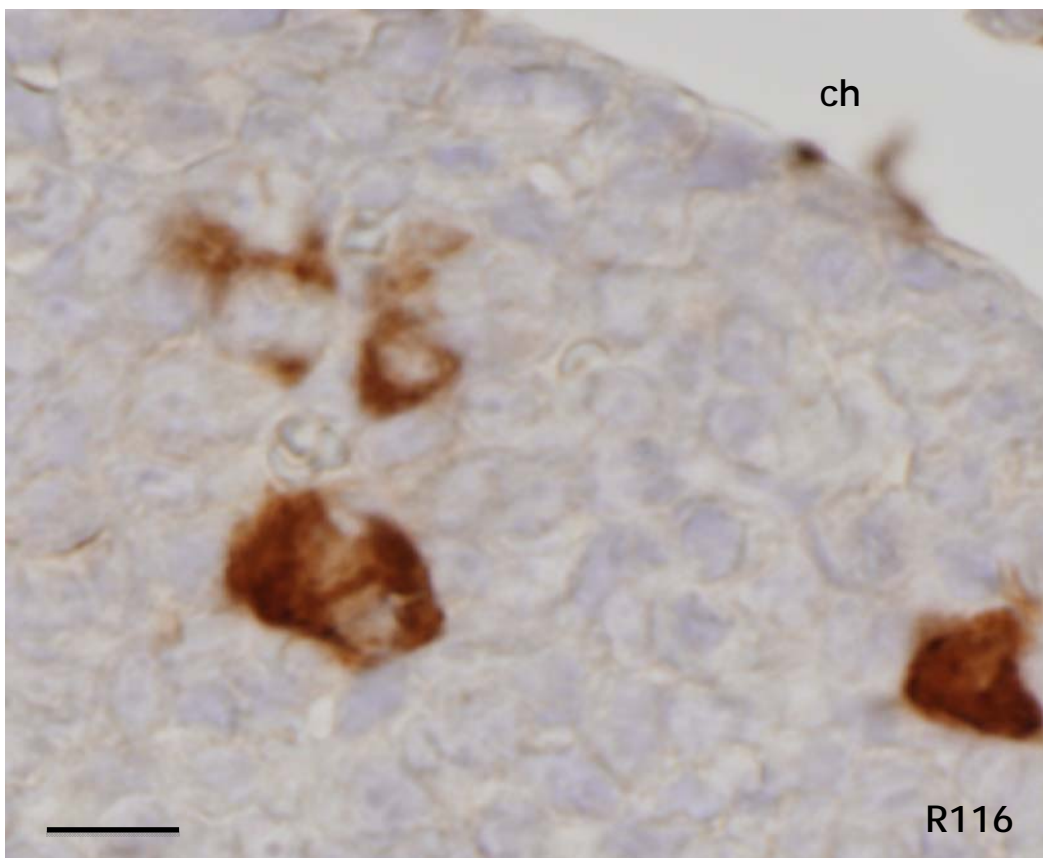
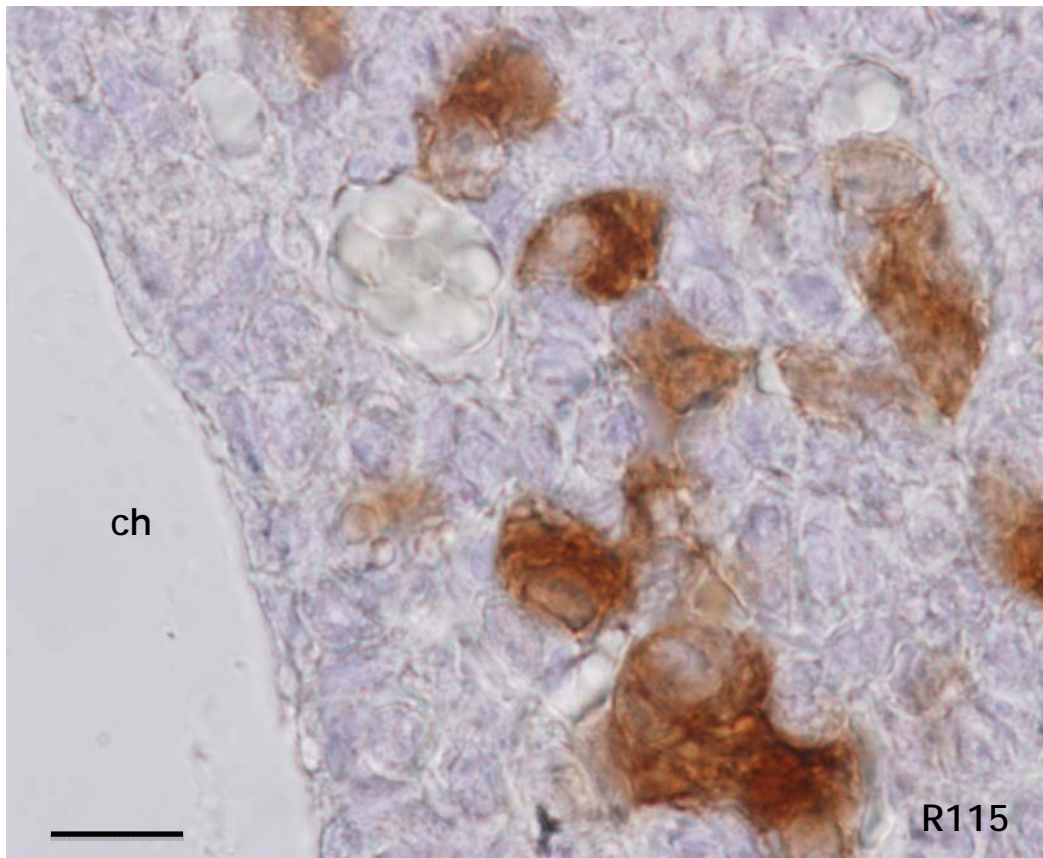


Sus núcleos aparecían hipocromáticos, ovales o redondos y casi siempre excéntricos, aunque sin polarización vascular definida.

Los citoplasmas presentaron aspecto granular aunque en ocasiones la reacción apareció afectando a todo el citoplasma por igual como una reacción condensada (figura R116), en otras ocasiones se dibujaban tramas que no llegaban a ser cisternales, y que daban un aspecto no homogéneo al citoplasma (figura R115).

Figura R115: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25

Figura R116: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en una hembra wild type. Barra x25
ch: caverna hipofisaria



En las hembras knock out, las células positivas a LH de esta región se caracterizaron por presentar forma redondeada o poligonal. A veces con grandes y largas prolongaciones citoplásmicas (figuras R117 y R118).

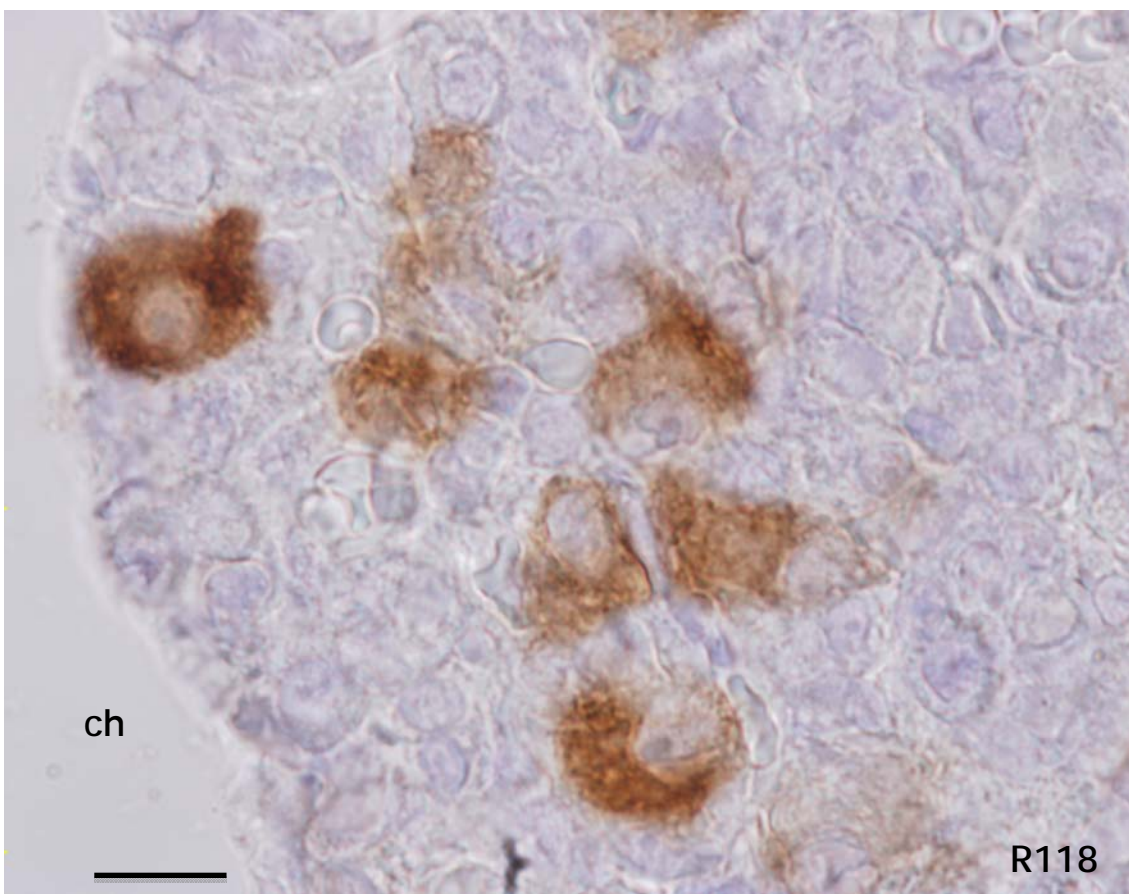
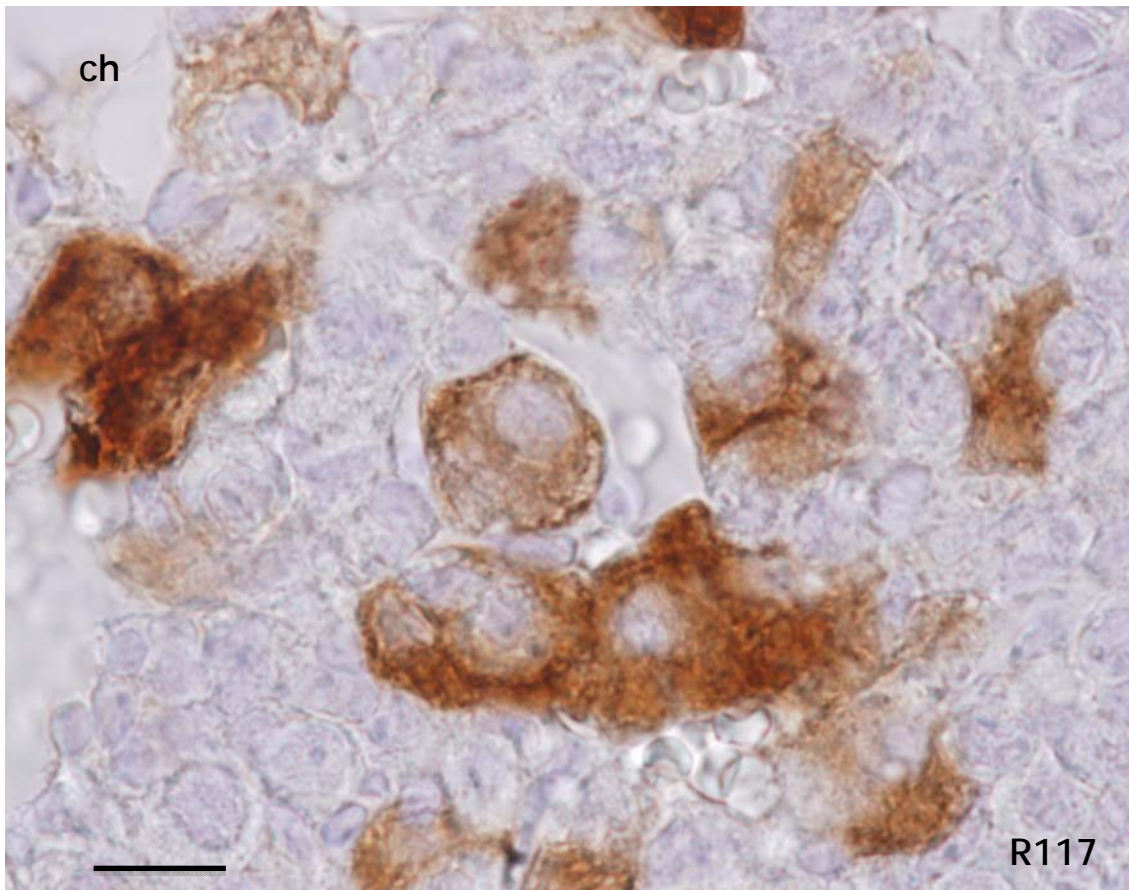
No fue raro observar que cuando las células contactaban con dos vasos a la vez, el núcleo se disponía centrado.

Los núcleos, redondeados, casi siempre fueron excéntricos hacia el polo avascular de la célula.

El citoplasma presentaba aspecto granular grueso muchas veces con imágenes cisternales que en ocasiones aparecían vacías y en otras llenas de reacción inmunocitoquímica (figura R117).

Figura R117: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25

Figura R118: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en una hembra knock out. Barra x25
ch: caverna hipofisaria



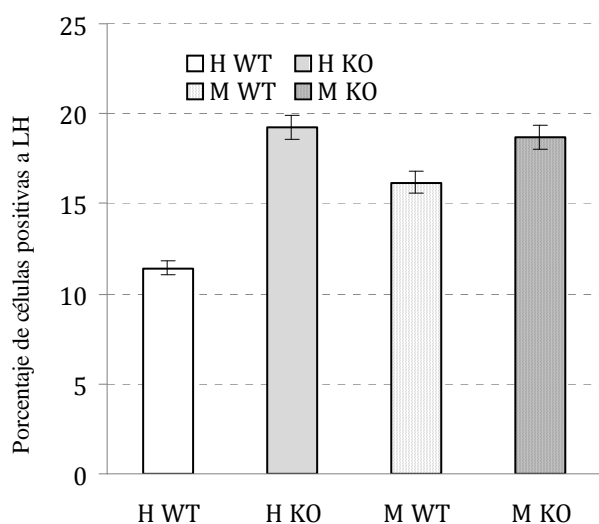
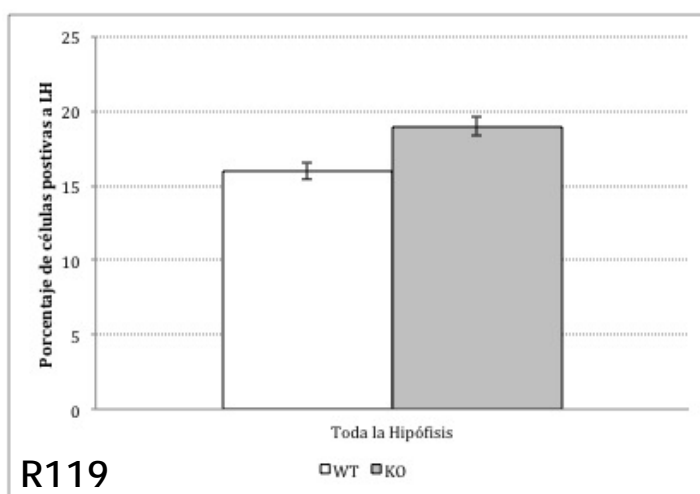
Células Gonadotropas positivas a LH en ratones machos.

Distribución general.

La distribución de las células gonadotropas positivas a LH presenta un patrón bien definido, aunque menos llamativo que en los ratones hembra.

De cara a poder efectuar un estudio comparativo de la distribución de las células positivas a LH entre las hembras y los machos, el patrón de distribución celular descrito para la hipófisis de las hembras, en el esquema de la figura R4, lo seguiremos utilizando a lo largo de la exposición de los resultados obtenidos en los ratones machos.

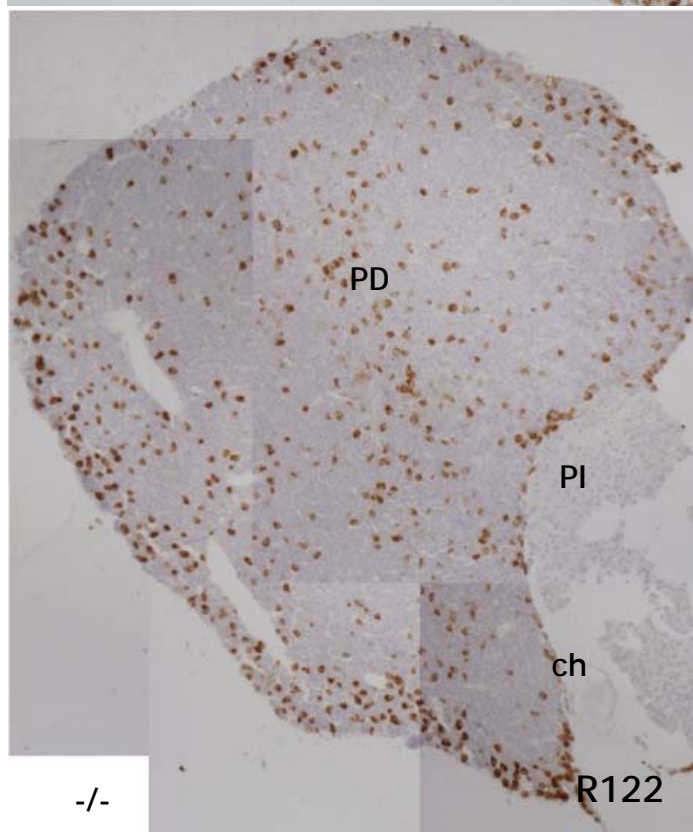
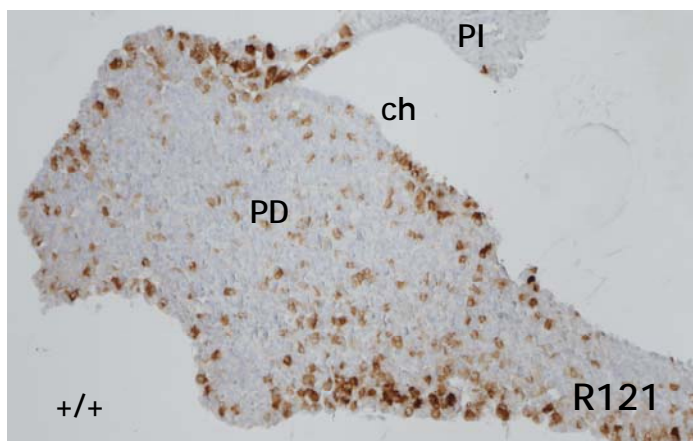
Cuantitativamente, las células positivas a LH fueron significativamente ($p < 0.05$) más abundantes en los machos knock out que en los wild type (figura R119).



En la figura R120 se representa la comparación entre los porcentajes de células positivas a LH en machos y hembras. Siendo evidente que el porcentaje de células positivas a LH fue mayor en los machos wild type que en las hembras wild type ($p < 0.05$). Sin embargo, no se apreciaron diferencias de género en los animales knock out, en los que los porcentajes fueron casi idénticos para machos y hembras.

Células gonadotropas positivas a LH en los machos de 22 meses de edad.

El aspecto general de visu que se obtiene al analizar a bajos aumentos la hipófisis de los ratones de 22 meses de edad es que hay menos células y, aparentemente, menos reactividad en los wild type que en los knock out. Como puede apreciarse en las figuras R5 y R6.



Las condensaciones celulares dorsales y ventrales son evidentes en todos los grupos estudiados.

El aumento de positividad aparece principalmente en la intersección de medial a lateral y en la mitad ventral de la hipófisis.

Siendo mucho menos evidente en la región dorsal, a excepción de la parte dorsal que queda dispuesta marginalmente en la proximidad de la pars intermedia, en la que claramente aumenta la positividad a LH.

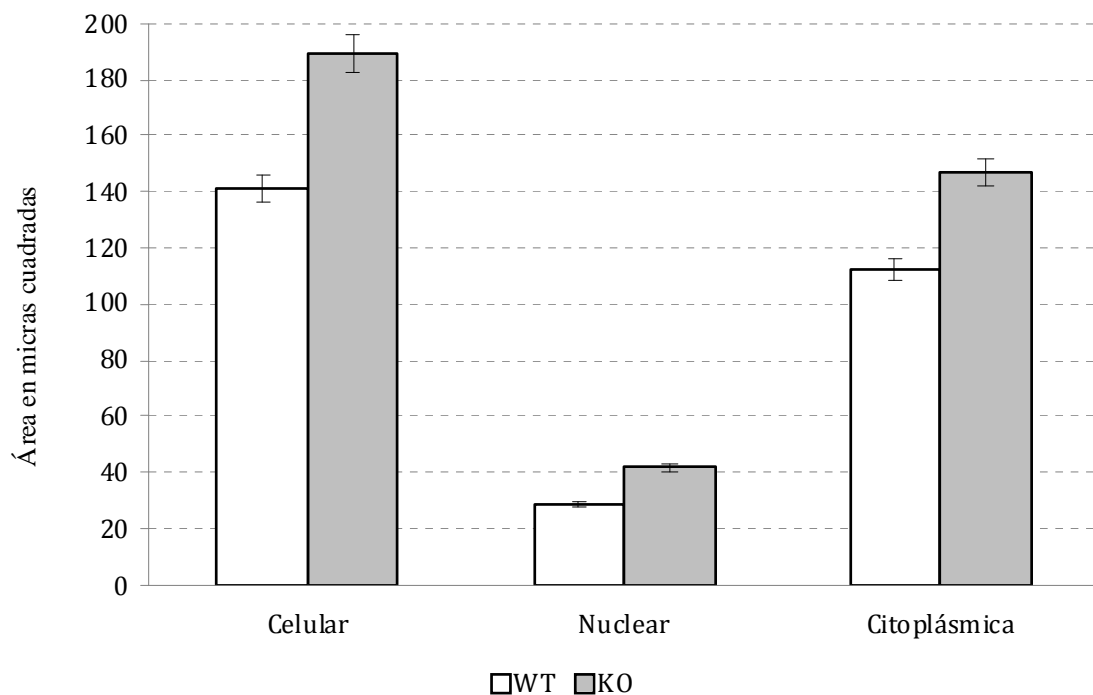
Figuras R121 y R122. Micrografías que muestran las características generales que se observan en los cortes frontales de la hipófisis de ratones machos de 22 meses de edad que se describen en el texto.

+/-: wilde type (R5).

-/-: knock out (R6).

PD: Pars Distalis, PI: Pars Intermedia, LN: Lóbulo Neural, ch: caverna hipofisaria.

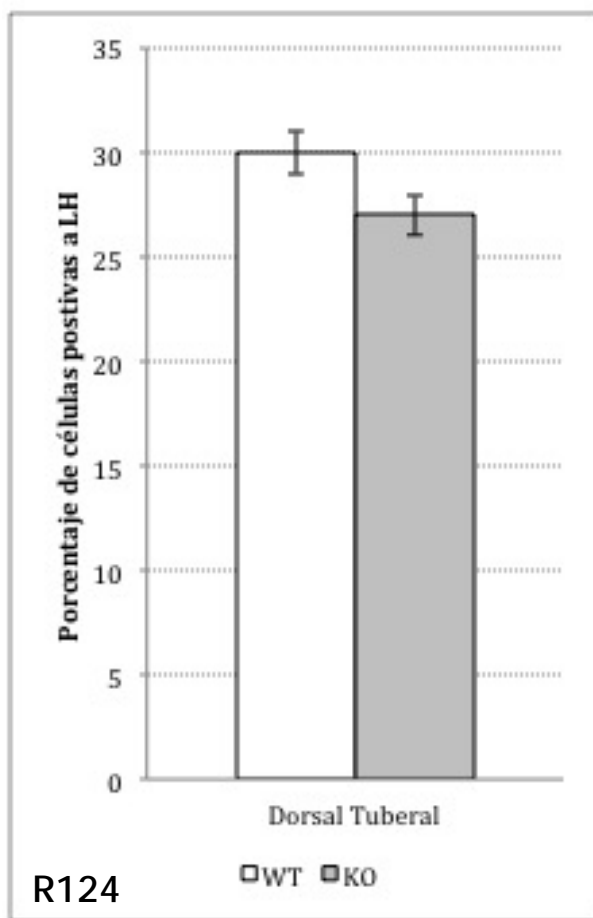
La morfometría puso de manifiesto que los machos knock out presentaron un mayor tamaño celular que los wild type, con un aumento en el área celular ($p<0.01$) a expensas de un mayor tamaño d el núcleo ($p<0.01$) y del citoplasma ($p<0.05$) (Figura R123).



Figuras R123. Gráfica que muestra las diferencias observadas en las áreas celular, nuclear y citoplásmica de células positivas a LH en el total de la hipófisis de los animales machos estudiados.

WT: wild type; KO: knock out. * = $p<0.01$, ** = $p<0.05$

Región Dorsal Tuberal(1).



Al igual que ocurría en las hembras wild type, el porcentaje de células positivas a LH en los machos wild type fue muy alta, casi del 30% y, aunque este porcentaje fue discretamente mayor que en los machos wild type, tampoco aquí las diferencias fueron significativas (figura R124).

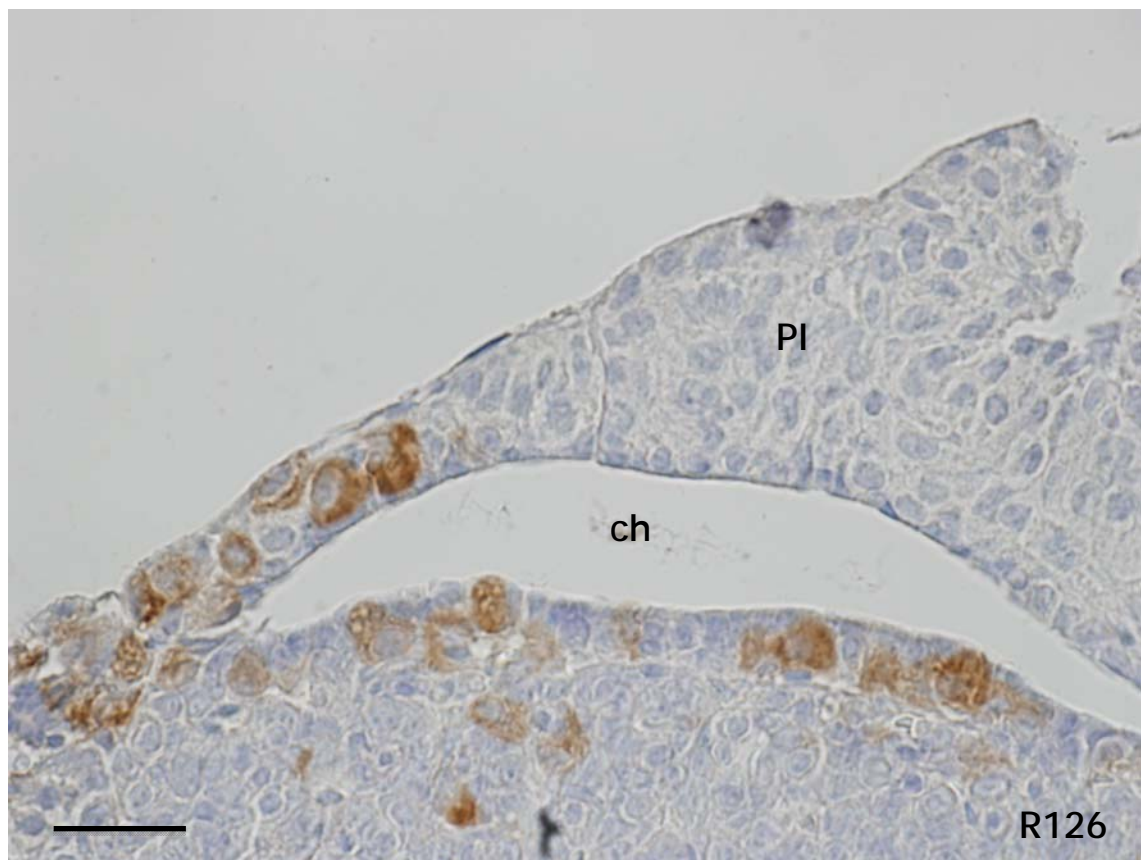
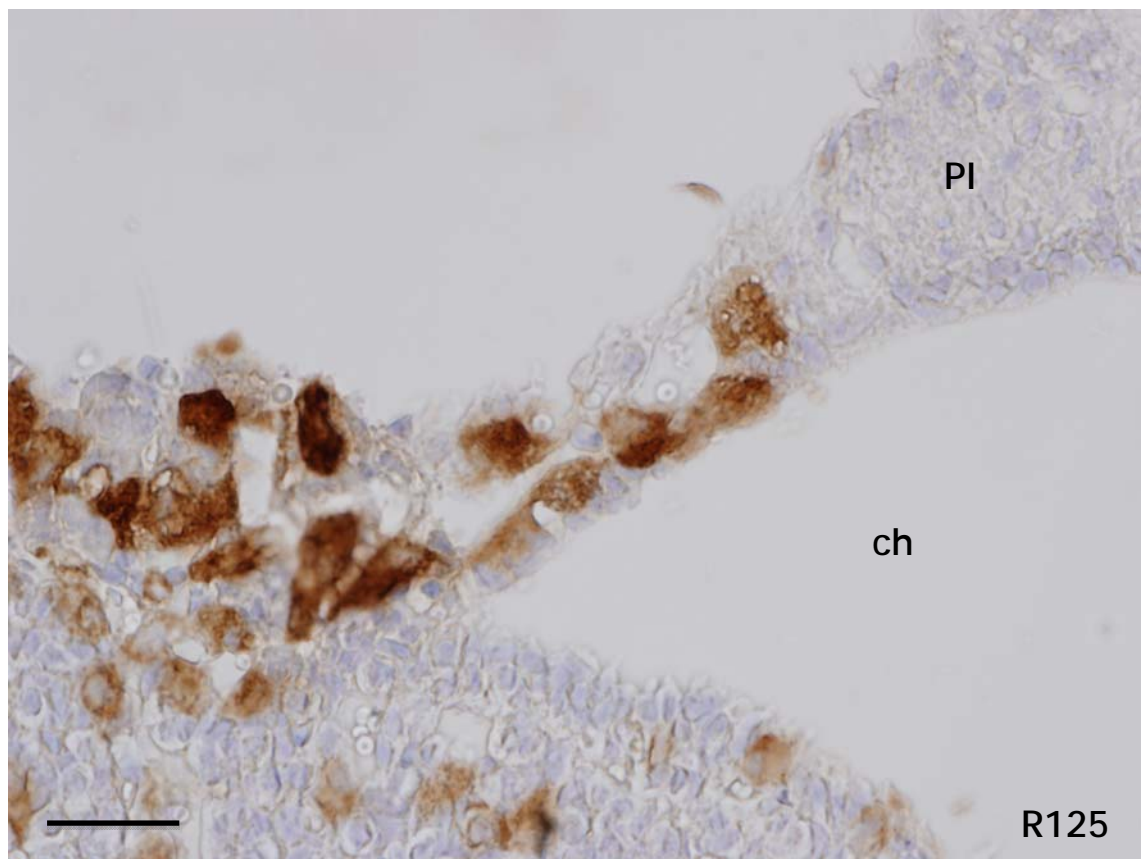
Comparativamente ni en los animales wild type, ni en los knock out se apreciaron diferencias significativas con respecto a las hembras.

Las células positivas a LH de esta región aparecen bien definidas, aunque con variaciones en la intensidad de reacción de unos animales a otros (figuras R125 y R126).

Prácticamente se extiende hasta los límites de la pars intermedia y, en ocasiones, la colonizan en su parte próxima a la pars tuberal.

Figura R125: Micrografía de la región dorsal tuberal mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50

Figura R126: Micrografía de la región dorsal tuberal mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50
ch: caverna hipofisaria. PI: pars intermedia.



La principal diferencia entre los machos knock out y los wild type observable a bajos aumentos del microscopio fue que los primeros presentaban mayor similitud en la intensidad de reacción de unos animales a otros (figuras R127 y R128).

También, como se aprecia en la figura R128 las células positivas a LH en estos animales presentaban una distribución formando cordones a lo largo de los vasos sanguíneos de la pars tuberal.

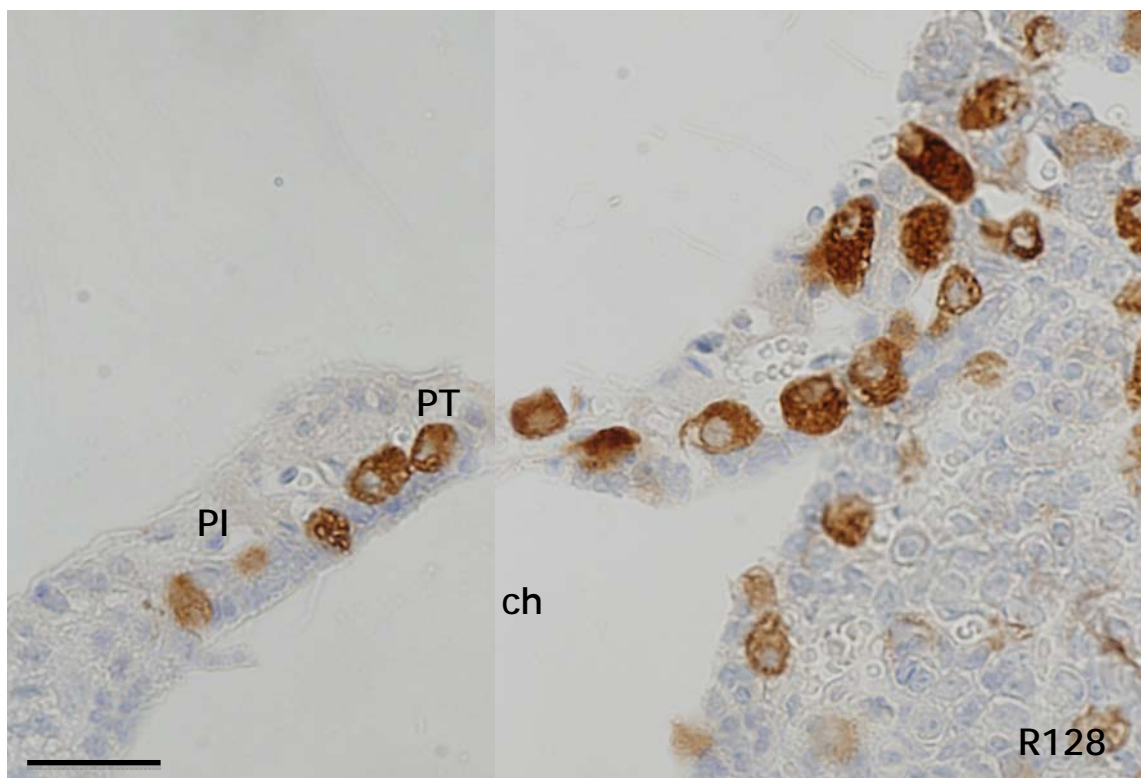
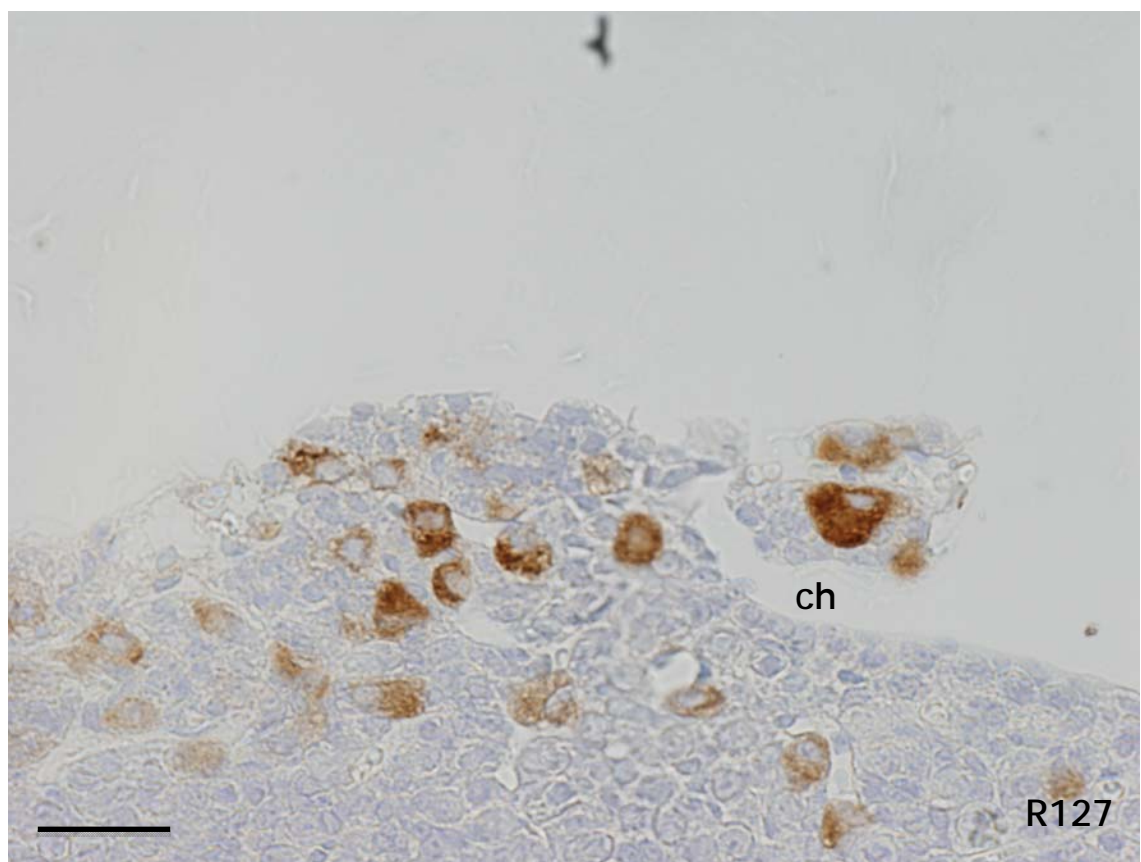
La colonización de la pars intermedia próxima a la pars tuberal por células positivas a LH de forma aislada, fue incluso más evidente que en los machos wild type.

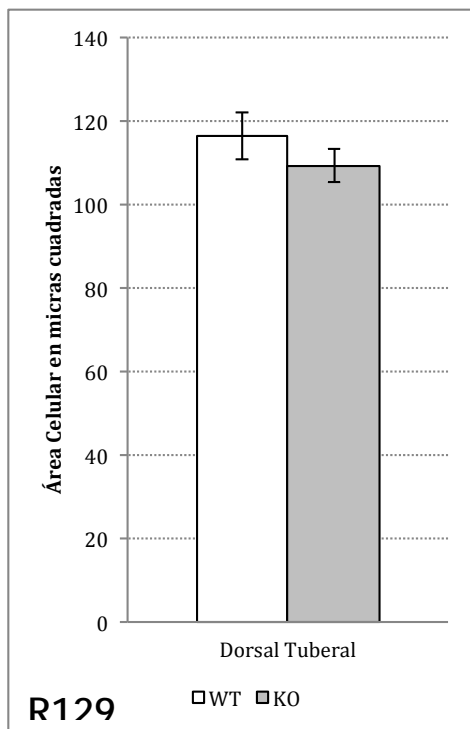
Dado que la pars intermedia es claramente diferente al resto de la adenohipófisis, estas células nunca fueron incluidas en los cálculos de porcentaje de esta región hipofisaria.

Figura R127: Micrografía de la región dorsal tuberal mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

Figura R128: Micrografía de la región dorsal tuberal mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

ch: caverna hipofisaria. PI: pars intermedia. PT: pars tuberal





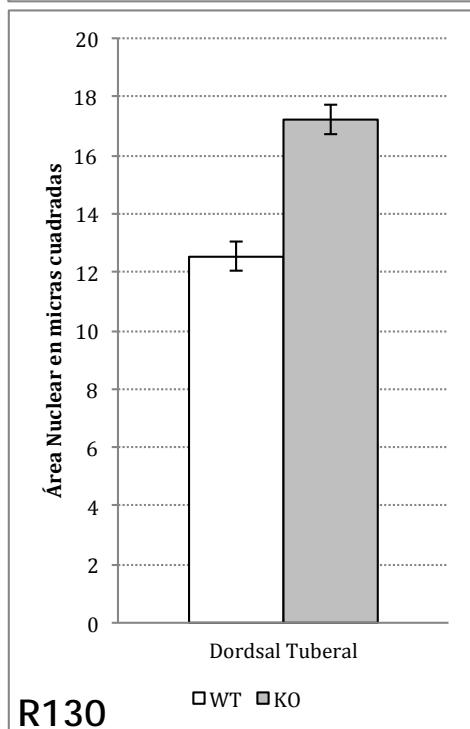
Los machos wild type mostraron variabilidad en el tamaño de las células positivas a LH de esta región, esta variabilidad dentro de un mismo animal o de unos animales a otros puede apreciarse en las figuras R131 y R132.

Lo mismo ocurrió en los animales knock out (figuras R133 y R134).

El resultado de esta variabilidad fue que no se apreciaron diferencias significativas en el tamaño celular entre los dos grupos de estudio (figura R129).

Por contra, el área nuclear en los machos knock out fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los animales knock out que en lo wild type (figura R130).

Comparativamente las áreas celulares en los machos, wild type o knock out, fueron significativamente mayores ($p < 0.005$ para los animales wild type, $p < 0.01$ para los animales knock out) que las observadas en las hembras.

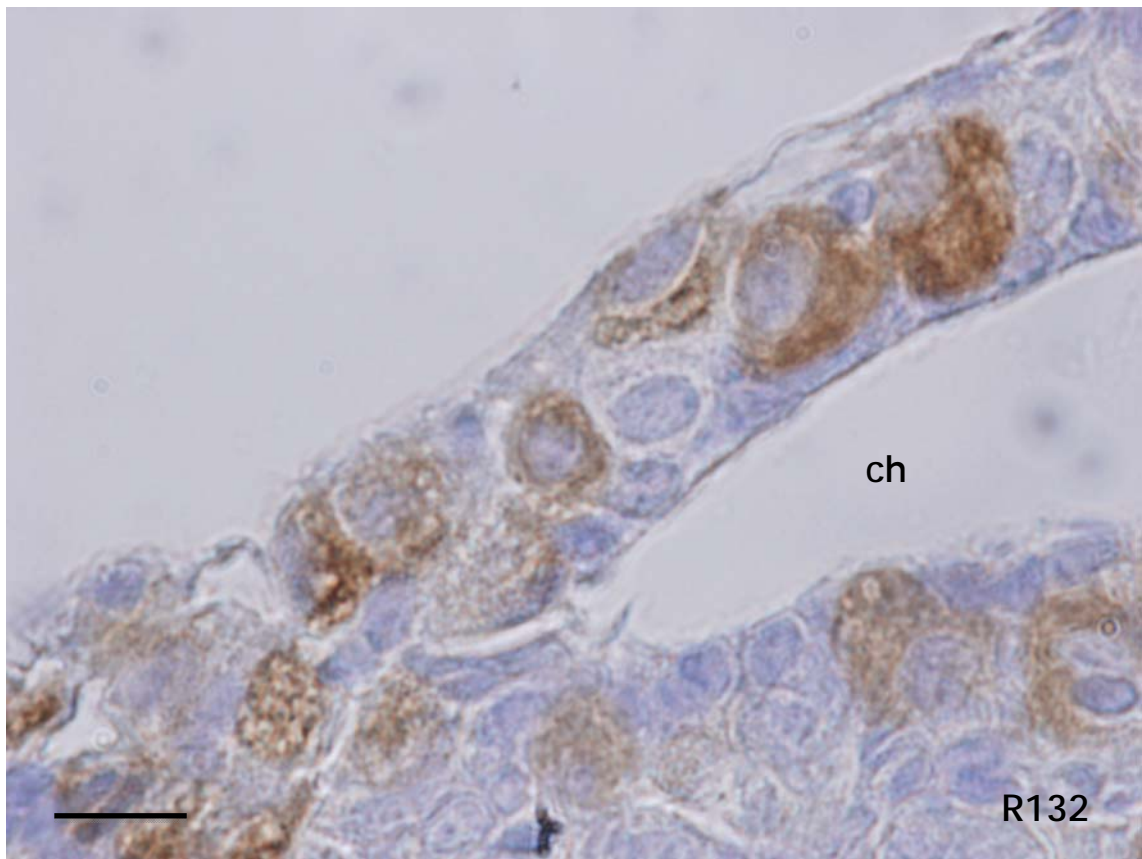
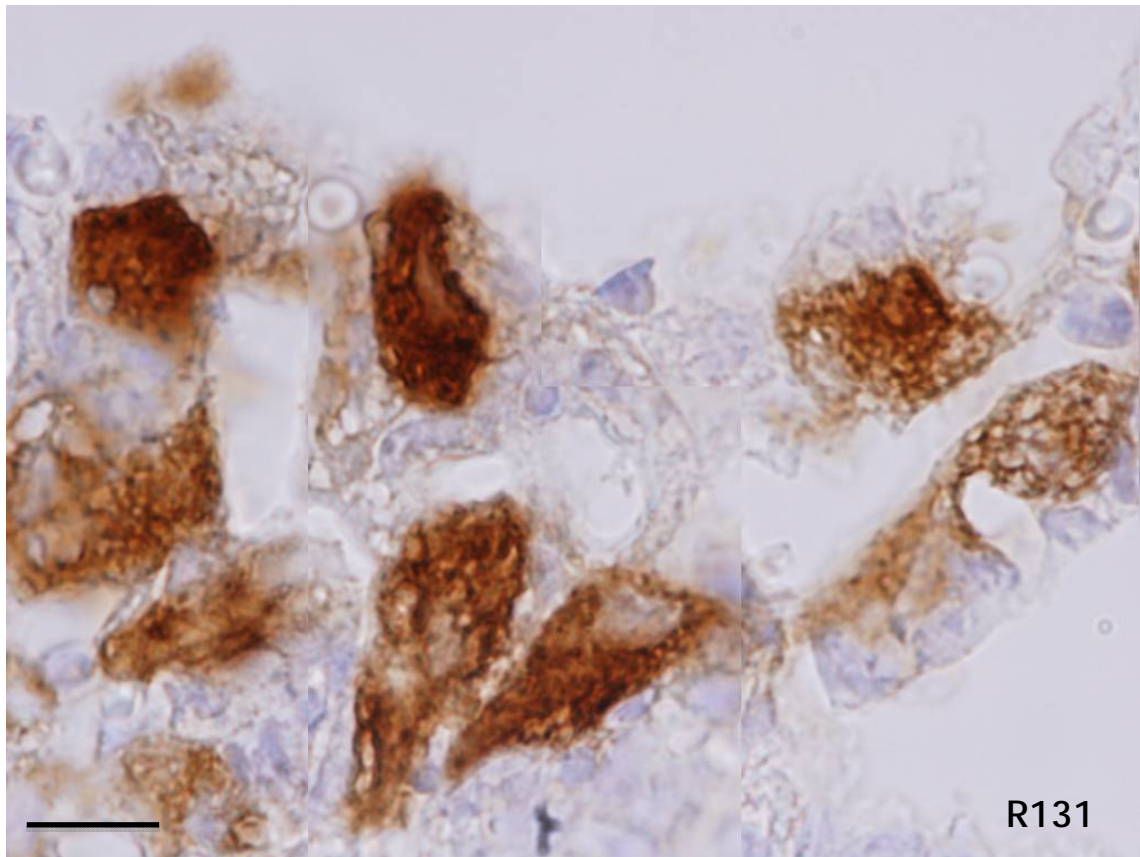


Las células positivas a LH en esta región de la hipófisis de los machos wild type no presentaron una morfología definida y tampoco patrones de reacción definidos.

Prácticamente la única característica común y destacable es que su citoplasma presentó un aspecto reticular debido a las dilataciones de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso.

Figura R131: Micrografía de la región dorsal tuberal mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25

Figura R132: Micrografía de la región dorsal tuberal mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25
ch: caverna hipofisaria



En los machos knock out, las células positivas a LH presentaron un aspecto más similar de unos a otros.

A grandes aumentos del microscopio, se aprecian claras diferencias de estas células con respecto a las observadas en los animales wild type.

Como puede observarse en la figura R133 (flechas finas) la intensidad de reacción de las células positivas a LH en general fue intensa; sin embargo algunas células, poco numerosas, presentaron un citoplasma casi velado con baja intensidad de reacción.

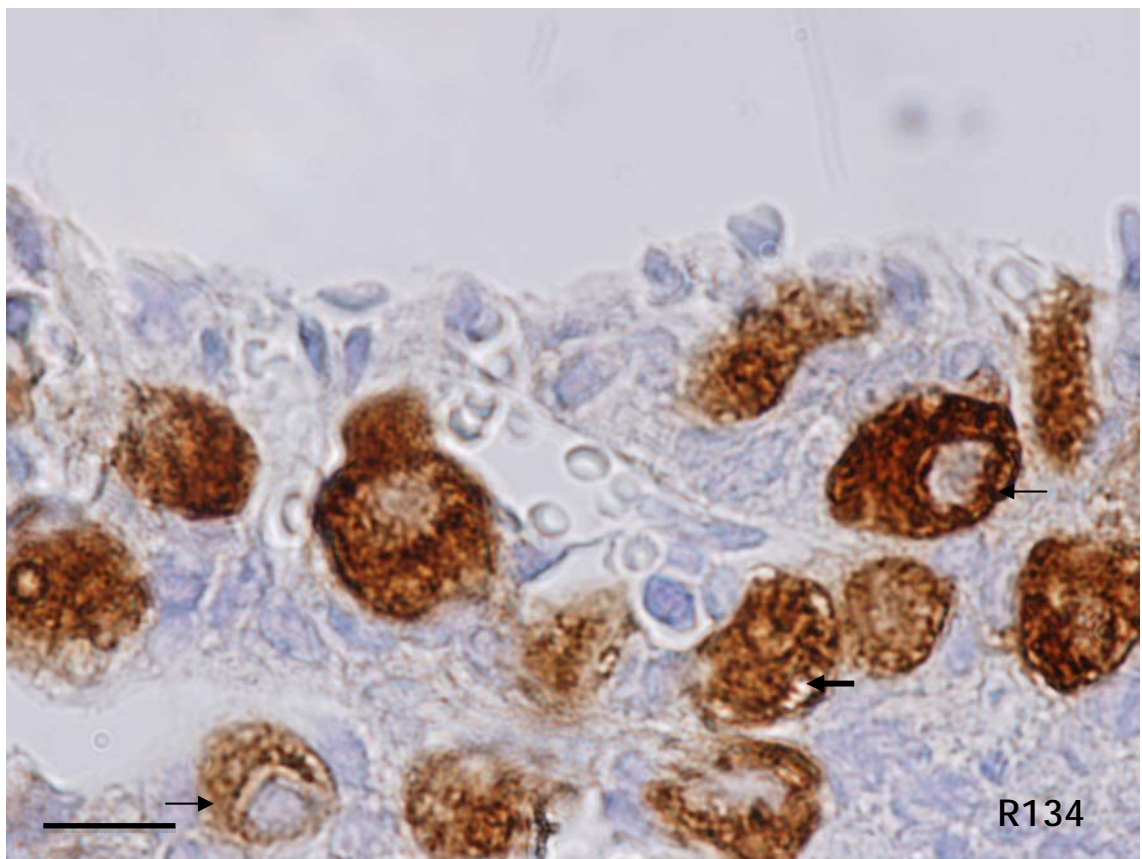
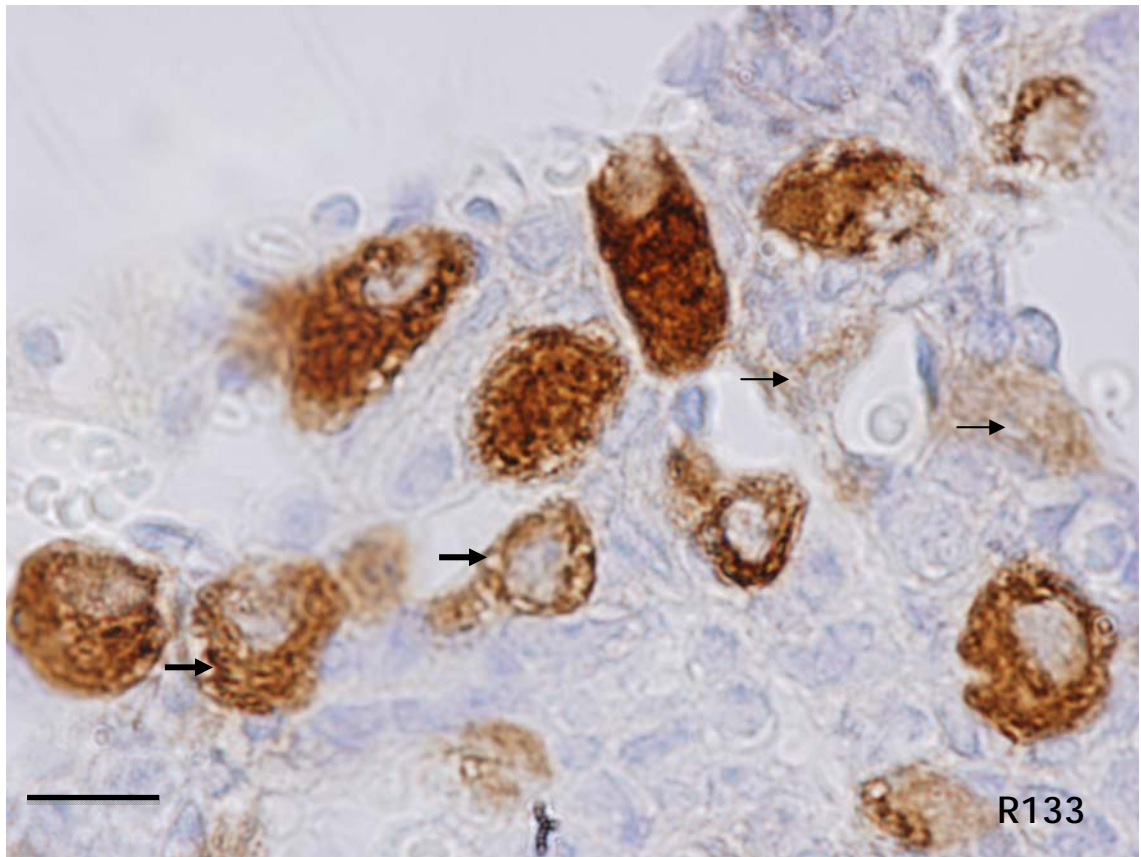
Casi todas las células presentaron un citoplasma de aspecto granular o trabecular, algunas células mostraron imágenes negativas por dilataciones del retículo endoplásmico rugoso (flechas gruesas en figuras R133 y R134).

Por último destacar que no fue infrecuente observar imágenes negativas del aparato de Golgi dispuestas en anillo perinuclear (flechas finas en figura R134).

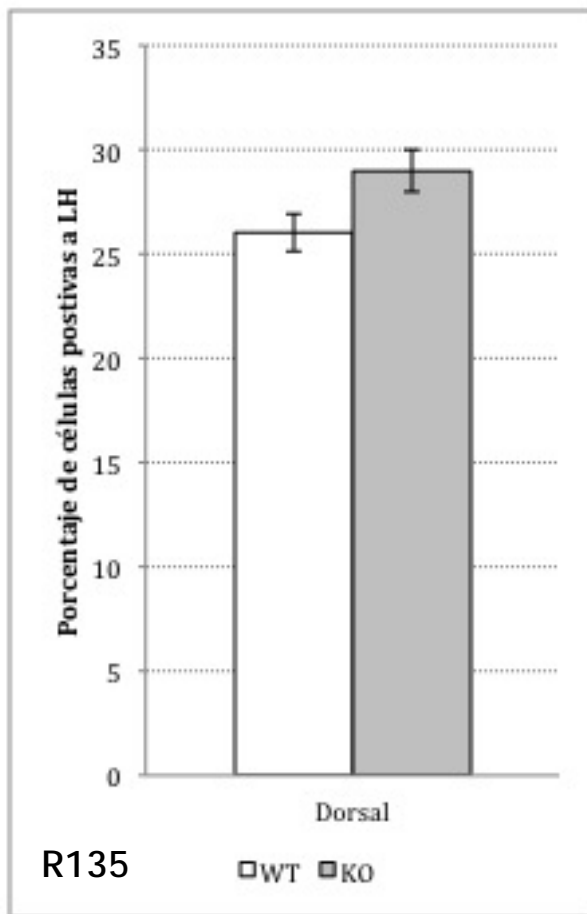
Otro dato interesante fue prácticamente todas las células presentaron un núcleo redondeado y polarizado.

Figura R133: Micrografía de la región dorsal tuberal mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25

Figura R134: Micrografía de la región dorsal tuberal mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25



Región dorsal (6).



Las células positivas a LH de la región dorsal de la hipófisis fueron más numerosas en los machos knock out que en los wild type, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura R135).

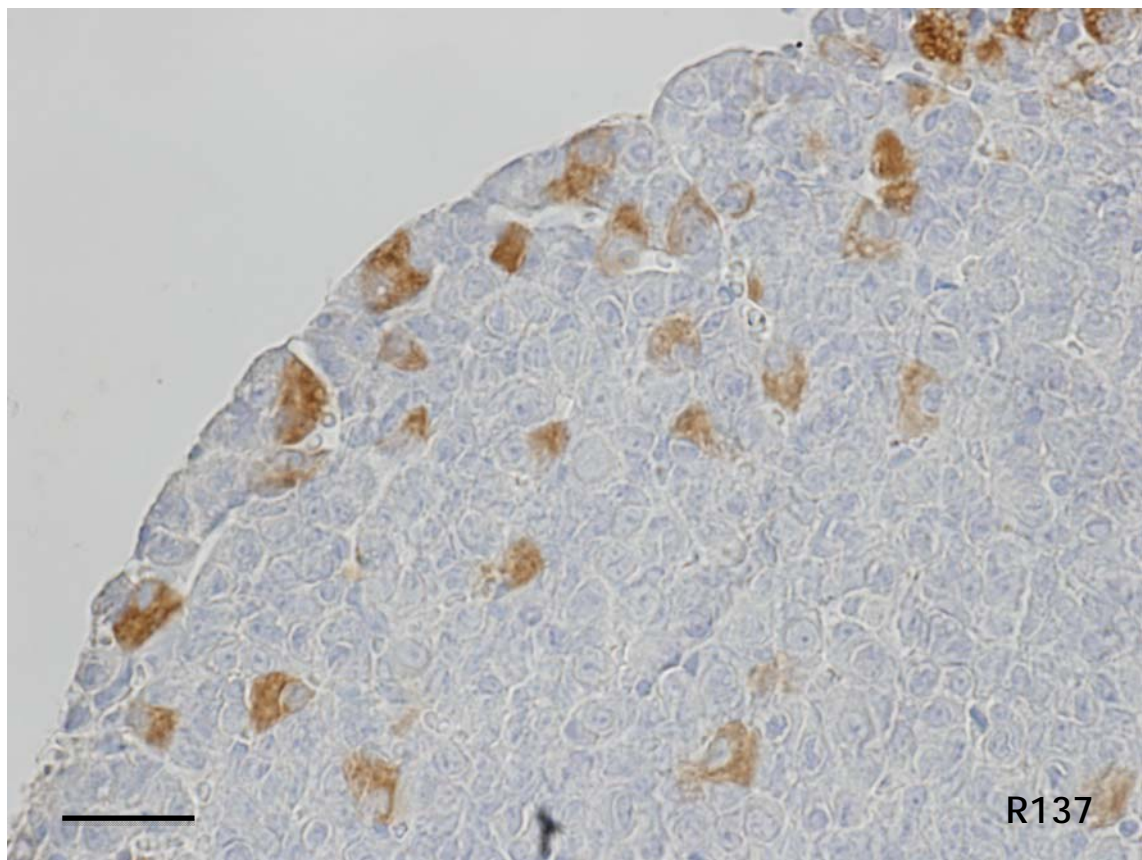
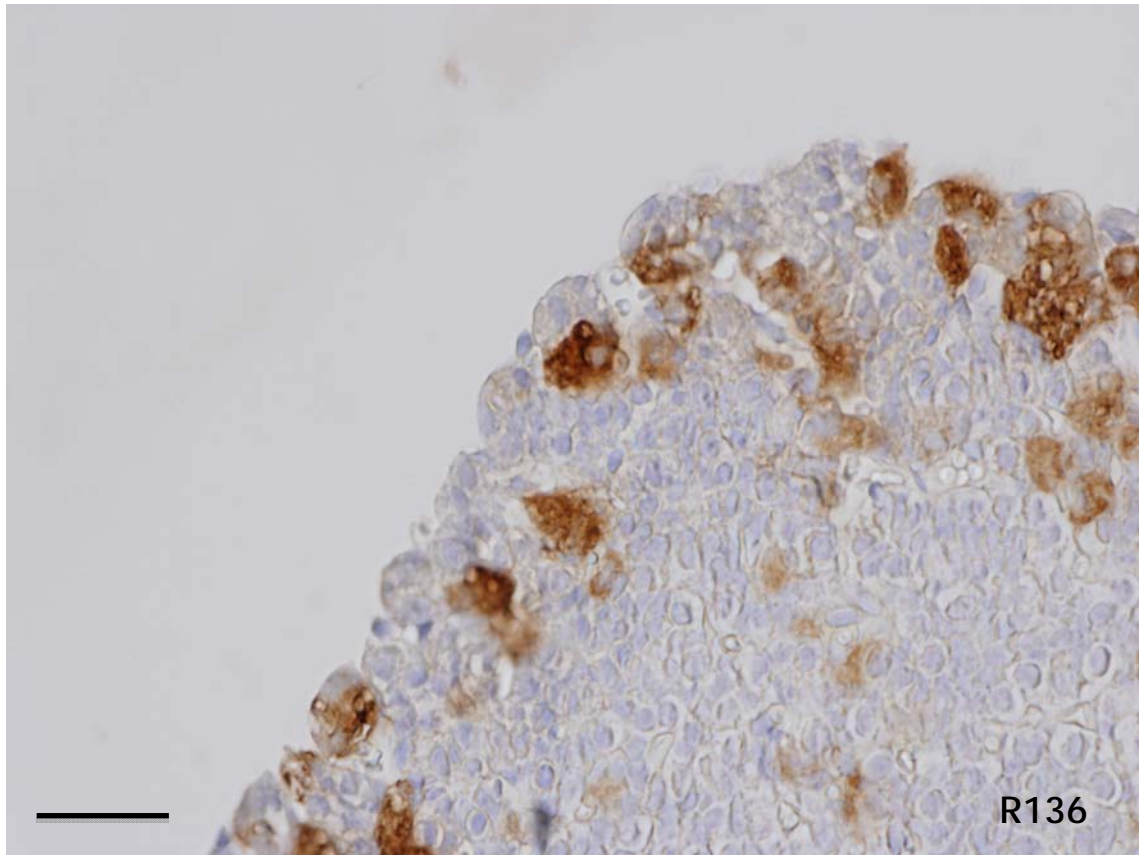
Al comparar hembras con machos, se constató que en esta región las células fueron mucho más numerosas en machos que en hembras ($p < 0.01$) independientemente de si eran wild type o knock out.

En los machos wild type, las células positivas a LH de la región dorsal de la hipófisis, se disponían preferentemente aisladas, aunque en ocasiones formaban grupos de 2 ó 3 células.

Dentro de la región se disponían preferentemente en el margen periférico de la glándula, siendo menos abundantes hacia la profundidad de la región.

Figura R136 Micrografía de la región dorsal mostrando las células positivas a LH en una macho wild type. Barra x50

Figura R137: Micrografía de la región dorsal mostrando las células positivas a LH en una macho wild type. Barra x50

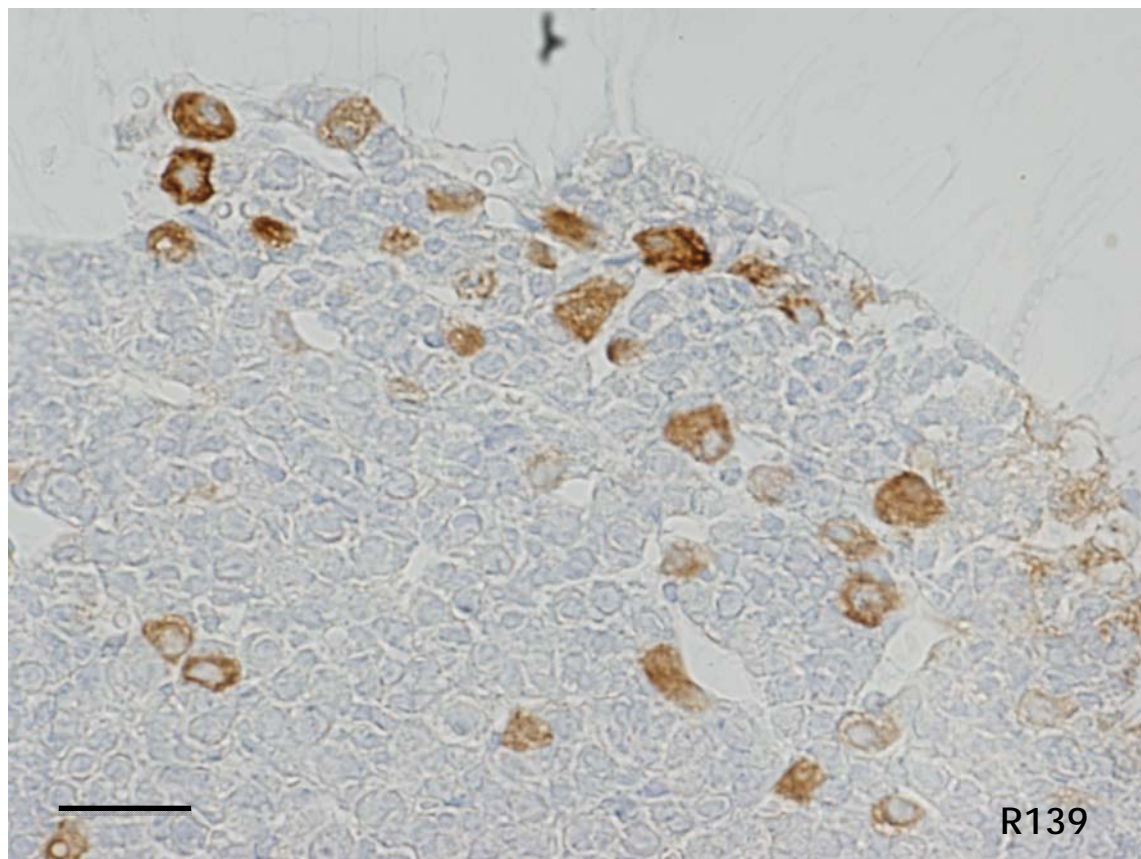
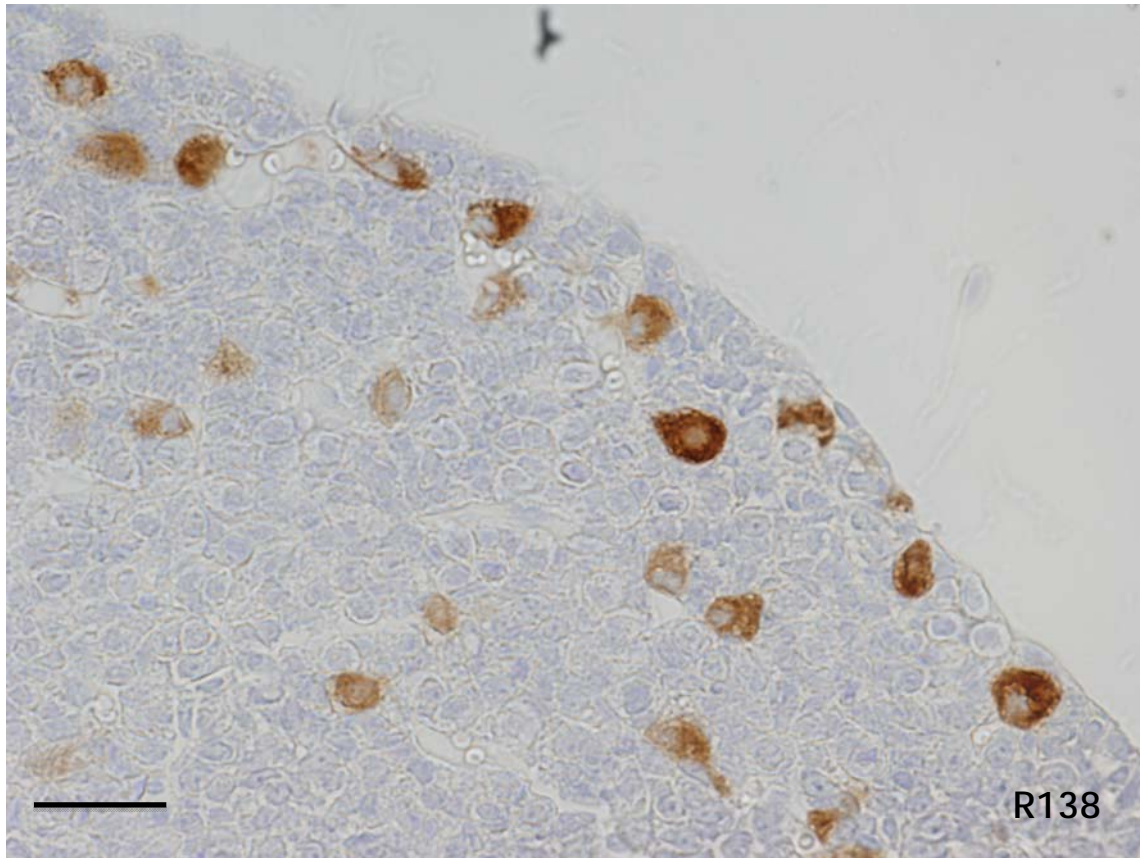


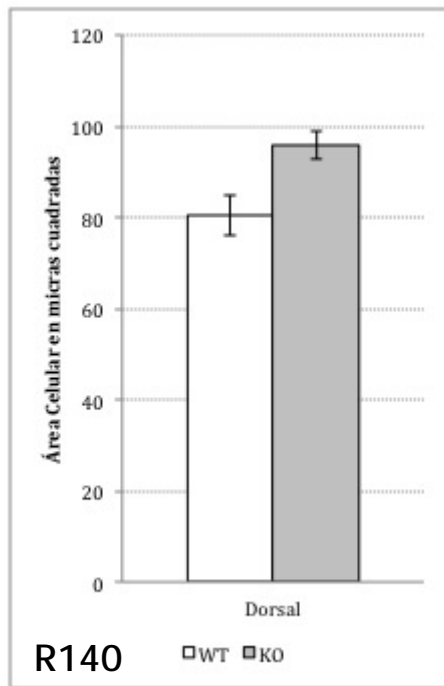
Como muestran las micrografías de las figuras R138 y R139, las características descritas para las células positivas a LH de la región dorsal de los machos wild type en lo que a su distribución y disposición en la región dorsal de la hipófisis son también válidas para los machos knock out: Aisladas, rara vez formando grupos pequeños y de predominio superficial más que profundo.

Como veremos mejor a aumentos altos de microscopio, las células aparecieron mejor definidas por presentar una reacción inmunocitoquímica más intensa.

Figura R138: Micrografía de la región dorsal mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

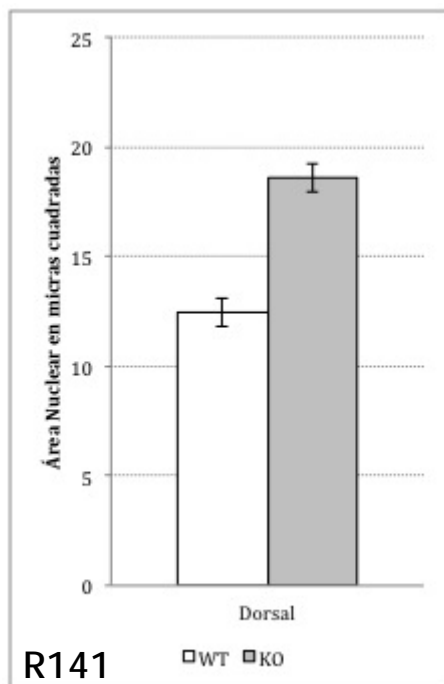
Figura R139: Micrografía de la región dorsal mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50





Las células positivas a LH de la región dorsal de la hipófisis de los machos knock out presentaron mayor tamaño ($p < 0.05$) que las de los machos wild type (figura R140).

Estas diferencias morfométricas fueron aún más llamativas al analizar el área nuclear que fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en los animales knock out que en los wild type (figura R141).



A grandes aumentos las células positivas a LH de los machos wild type aparecían como células con una intensidad de reacción inmunocitoquímica media.

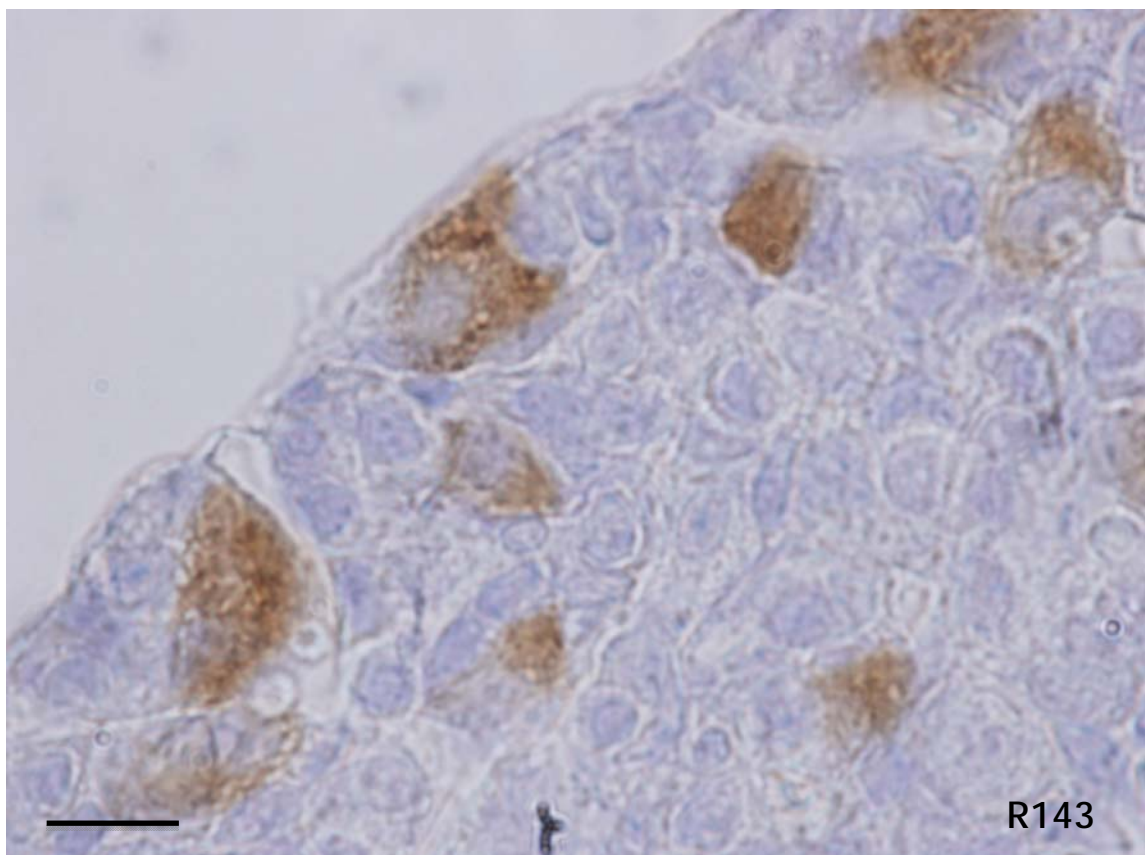
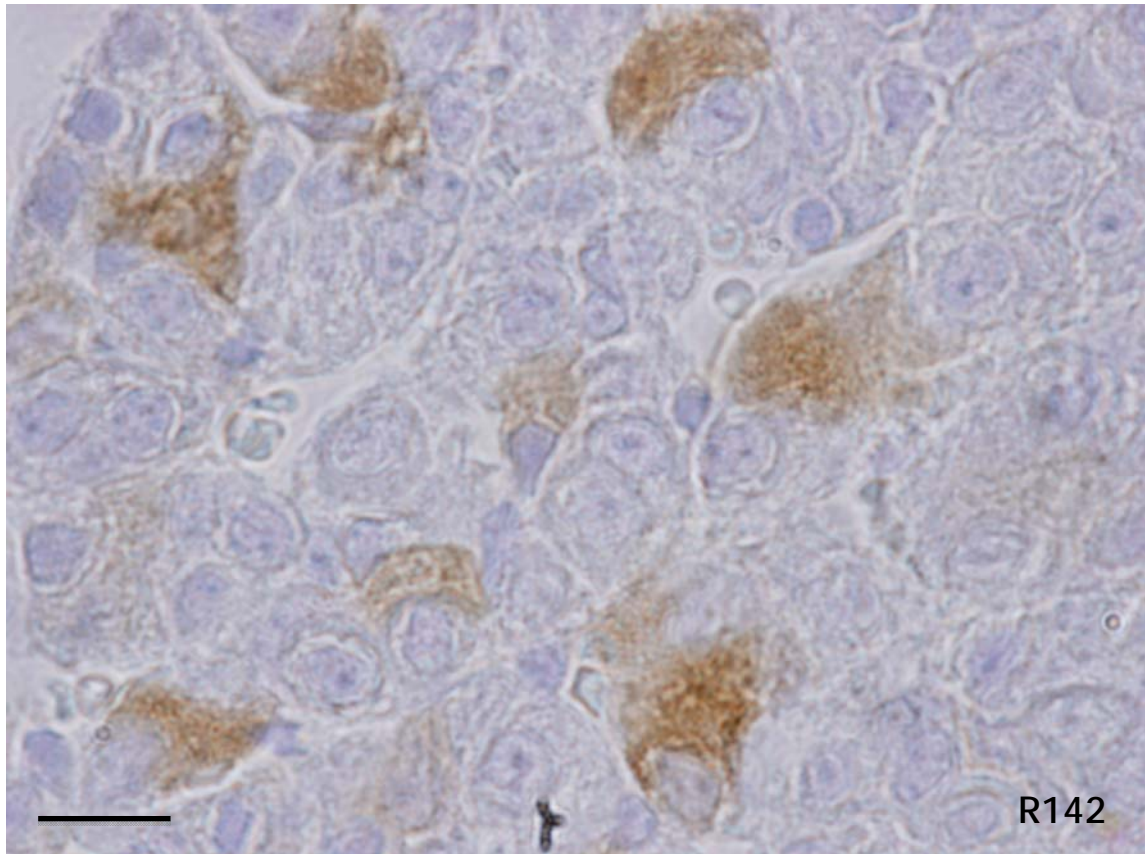
Aunque algunas células eran poligonales, la mayoría tenían formas irregulares debido a presentar prolongaciones citoplásmicas abrazando a células no reactivas.

Sus citoplasmas presentaban aspecto granular fino, bastante homogéneo.

Los núcleos, generalmente ovalados solían ser excéntricos.

Figura R142 Micrografía de la región dorsal mostrando las células positivas a LH en una macho wild type. Barra x25

Figura R143: Micrografía de la región dorsal mostrando las células positivas a LH en una macho wild type. Barra x25



En los machos knock out, las células positivas a LH de la región dorsal eran más regulares en su forma que las de los wild type; predominando las formas ovaladas y las poligonales.

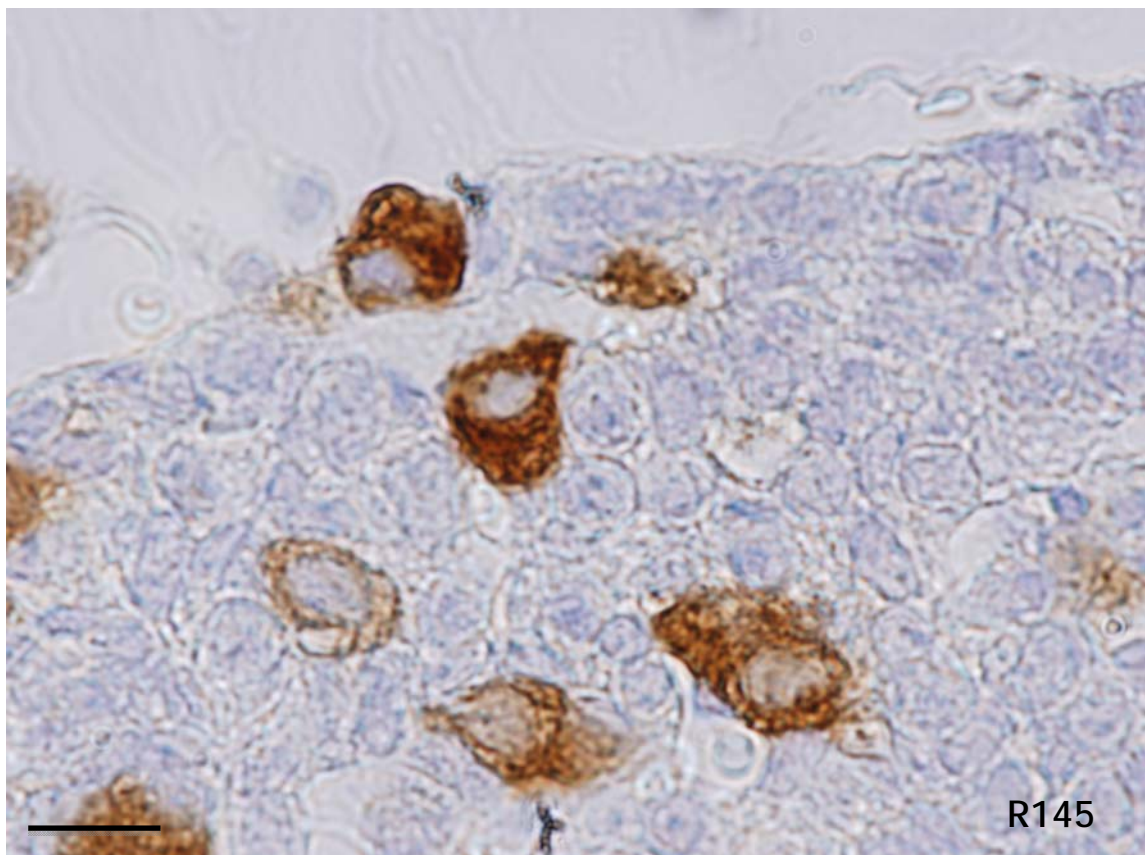
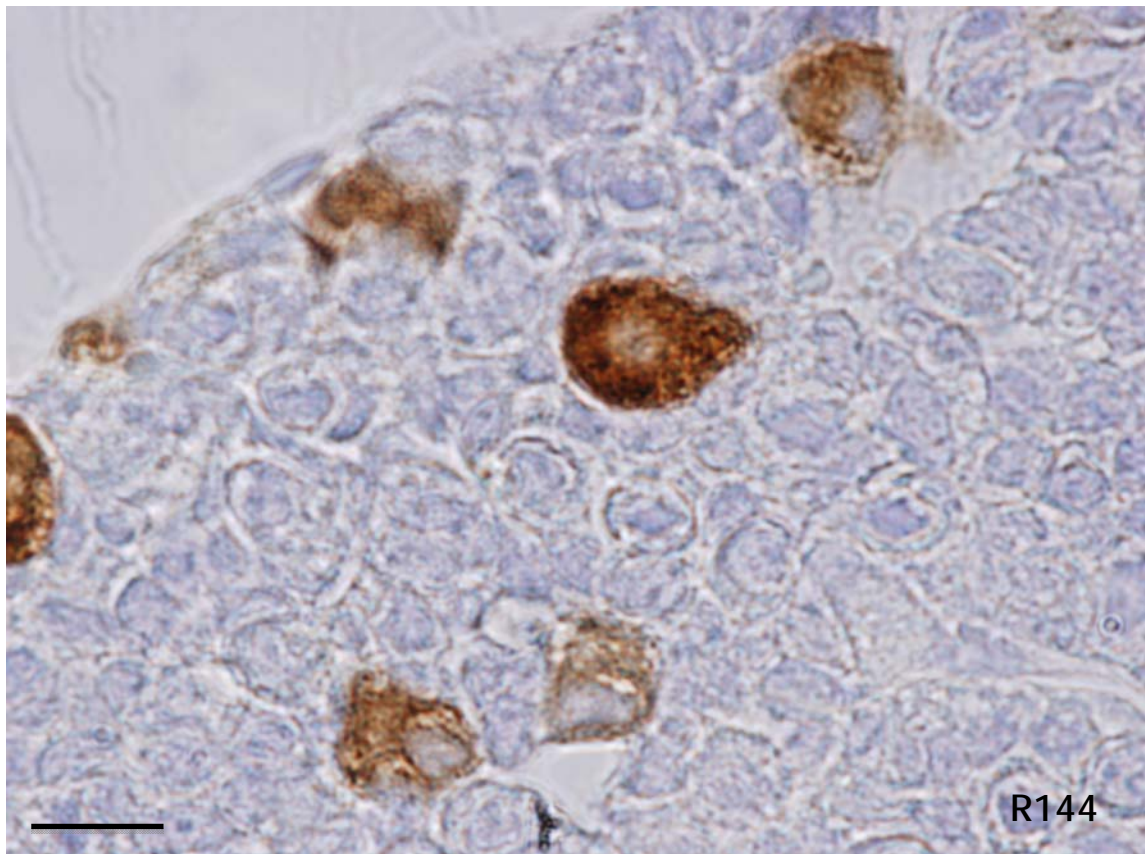
Aunque se observaron dos patrones de reacción, fuerte y débilmente teñidas, en general la intensidad de la reacción citoplásmica fue mayor en estos animales que en los wild type.

Los citoplasmas presentaron aspecto granular fino, pero a diferencia de las células en los wild type, en estos animales fue muy frecuente apreciar imágenes negativas del aparato de Golgi perinucleares, e imágenes cisternales de retículo endoplásmico rugoso, a veces con vacuolización.

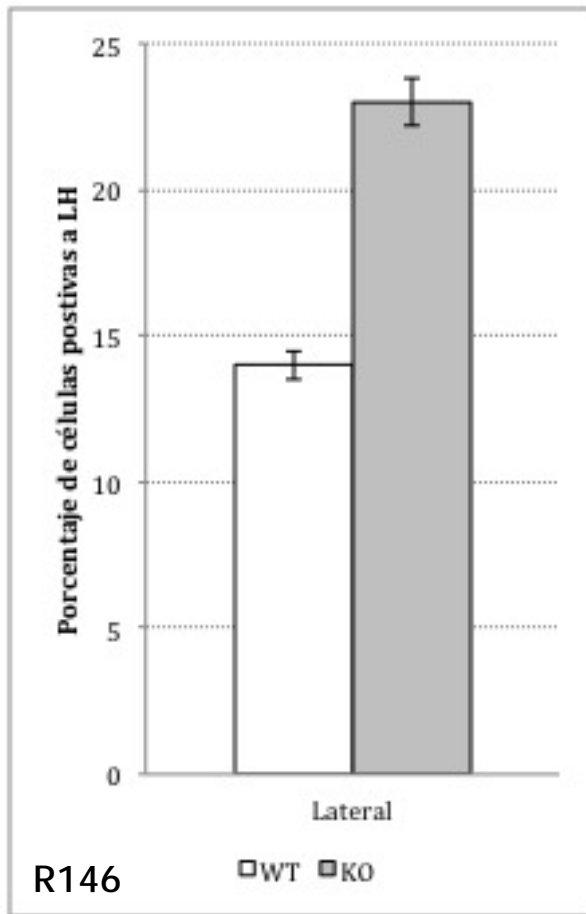
Los núcleos fueron ovales y grandes, casi siempre excéntricos y a veces con nucleolo.

Figura R144 Micrografía de la región dorsal mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25

Figura R145: Micrografía de la región dorsal mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25



Región lateral (5).



El porcentaje de células positivas a LH en la región lateral de la hipófisis de los machos knock out fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que el observado en los machos wild type (figura R146).

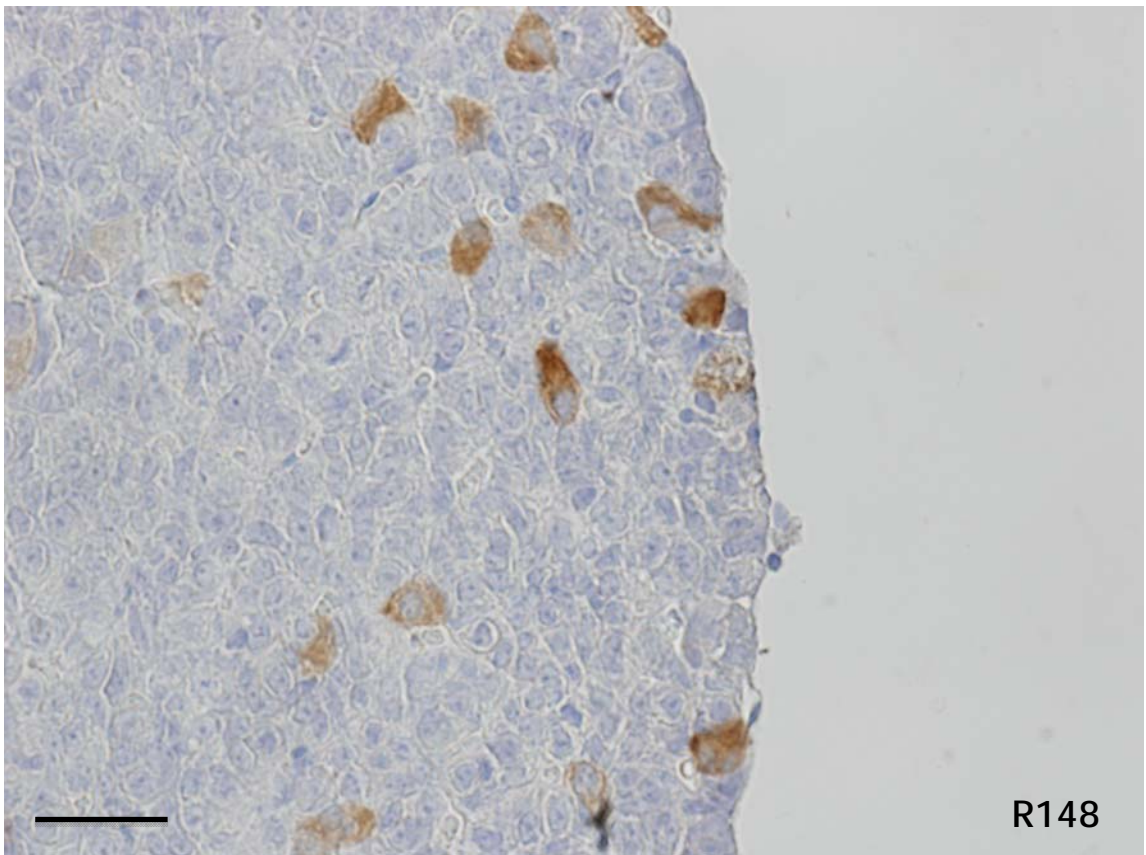
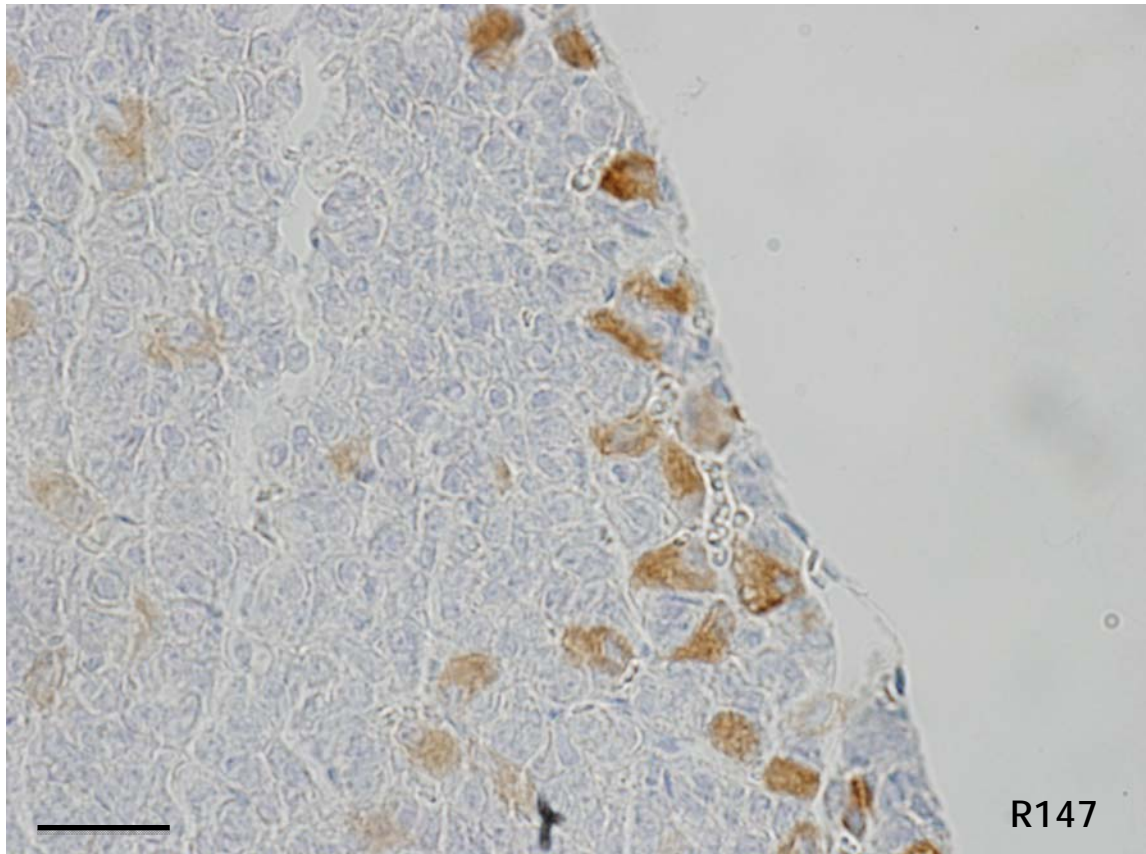
Estas células en los machos wild type presentaron una reacción intermedia y aparecieron aisladas y diseminadas por la región, localizándose principalmente en la parte más marginal de la misma (figuras R147 y R148).

Hacia la profundidad de esta región las células fueron escasas y, como puede

apreciarse en la figura R148, tanto en la zona profunda como en la superficial, existieron grandes áreas en las que no había células positivas a LH.

Figura R147: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50

Figura R148: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50



En los machos knock out, las células positivas a LH de la región lateral de la hipófisis presentaron una reacción inmunocitoquímica más intensa que en los wild type.

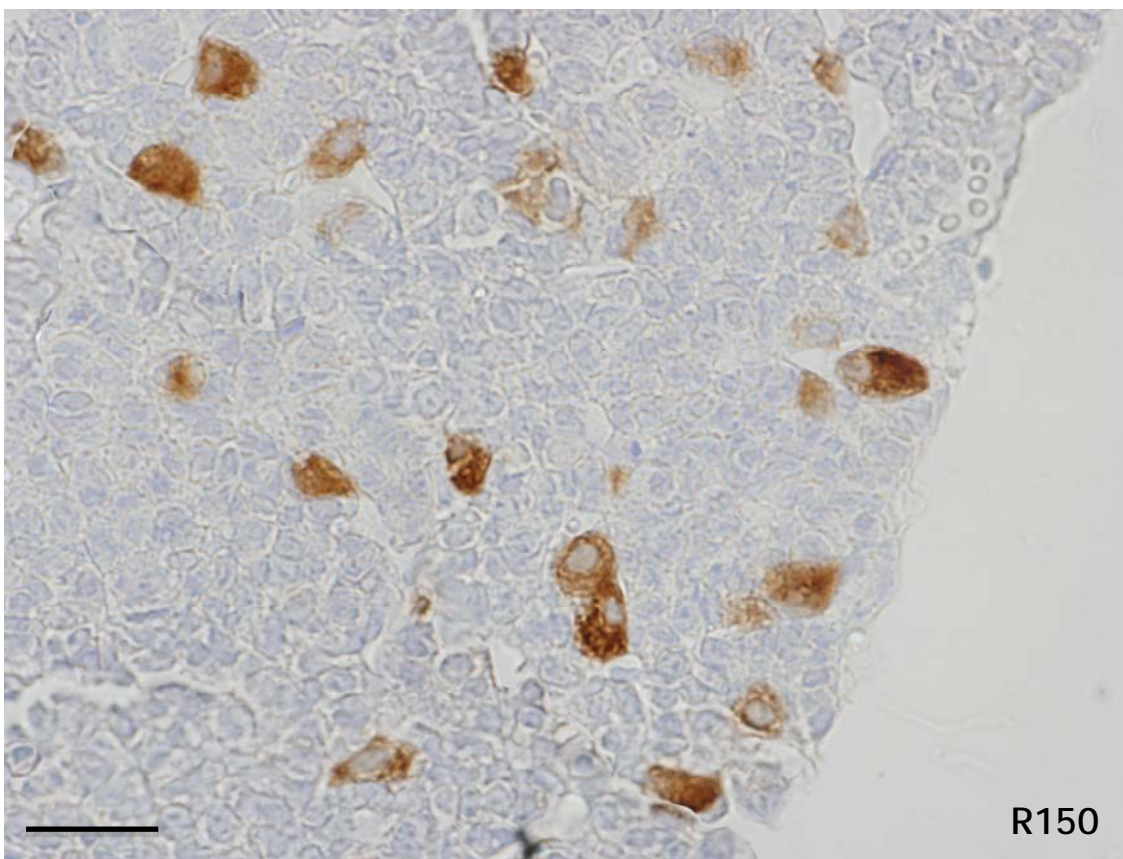
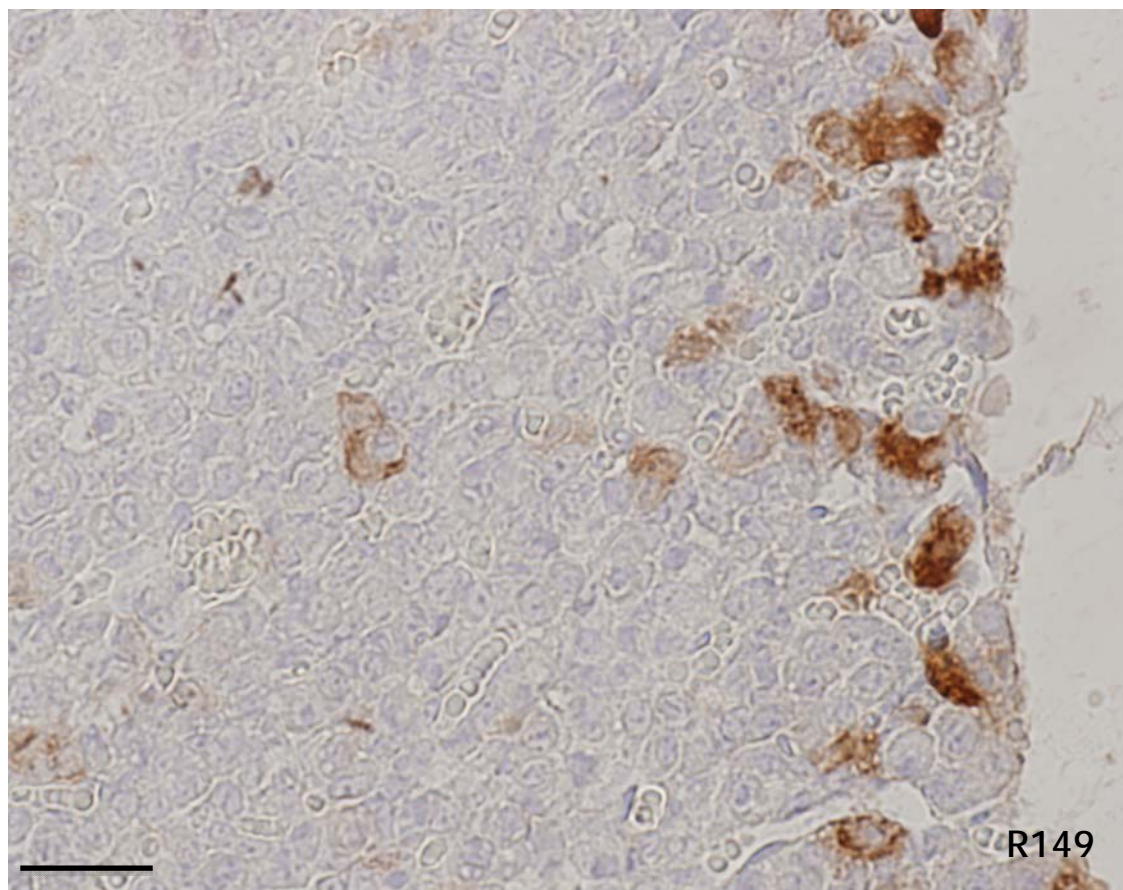
Como puede apreciarse a bajos aumentos de microscopio, estas células adoptaron dos patrones de distribución:

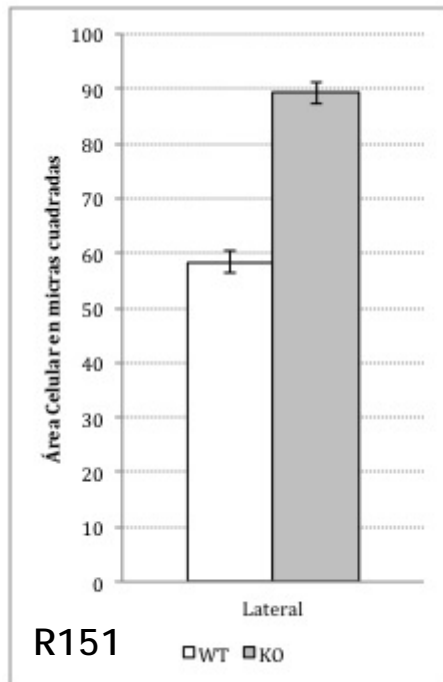
En uno de ellos (figura R149) las células eran preferentemente superficiales y aparecían formando cordones celulares cortos, generalmente en relación con un vaso sanguíneo.

En el otro (figura R150) las células aparecieron más dispersas pero ocuparon las zonas superficial y profunda de la región.

Figura R149: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

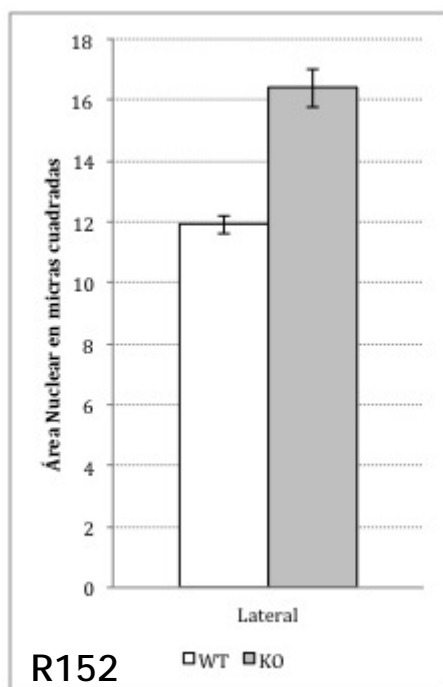
Figura R150: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50





Las células positivas a LH en la región lateral fueron considerablemente mayores (figura R151) en los machos knock out que en los wild type ($p<0.01$).

Lo mismo ocurría (figura R152) al analizar las áreas nucleares ($p<0.01$).



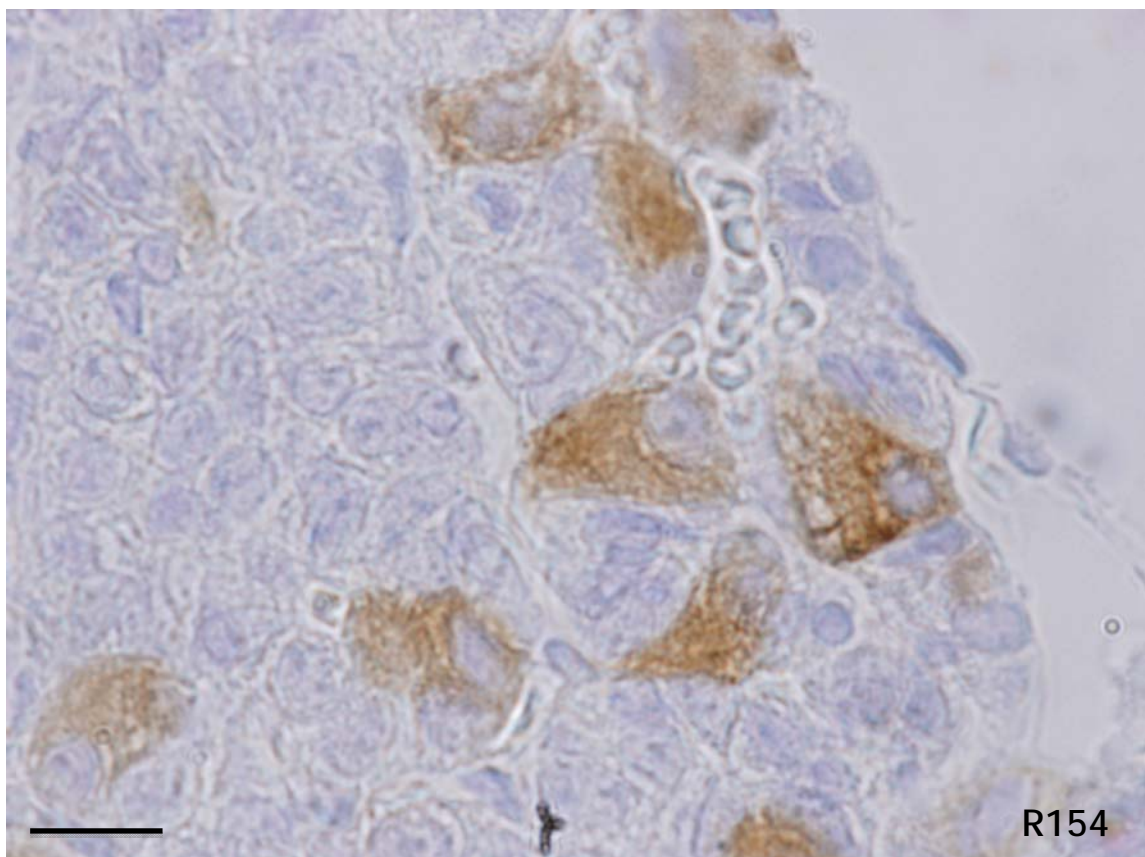
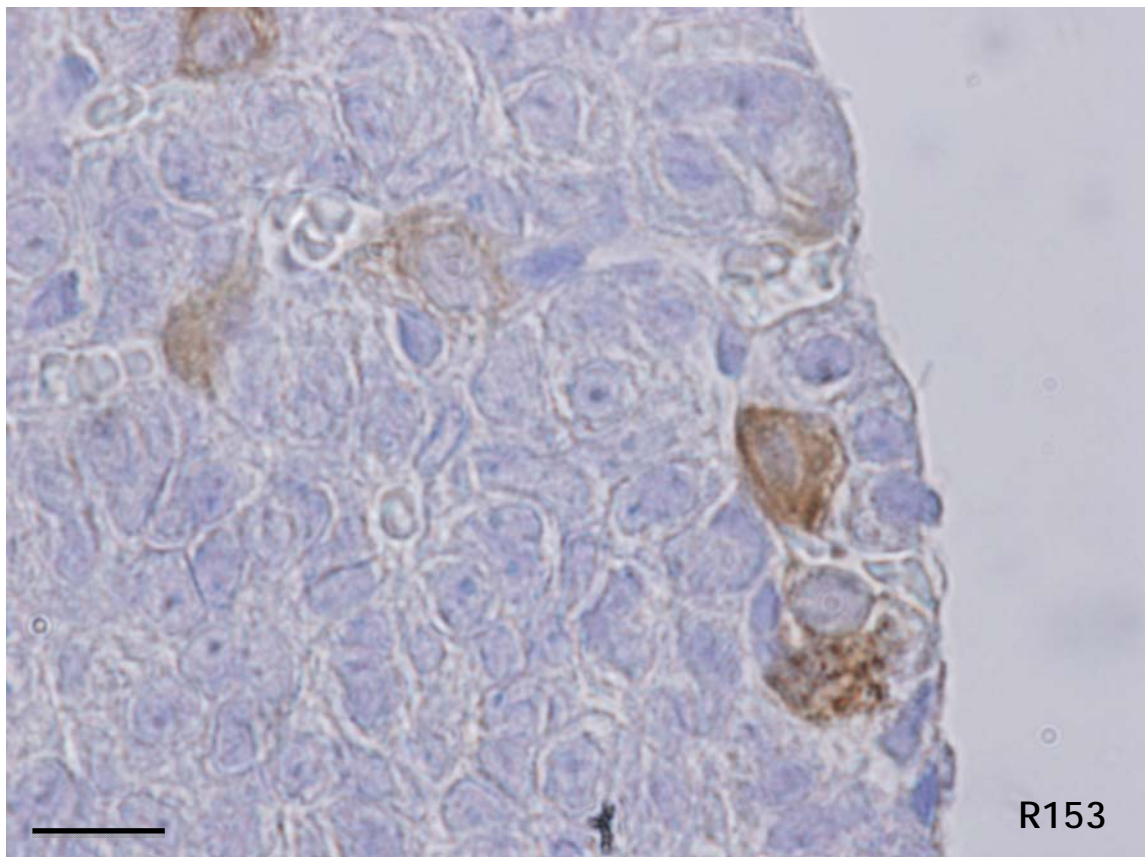
En los machos wild type, a aumentos altos de microscopio) se apreció que las células positivas a LH presentaron un aspecto variable en su forma, apareciendo células poligonales y células con prolongaciones citoplásmicas alargadas (figuras R153 y R154).

Los núcleos eran excéntrico, muchas veces con nucleolo.

Los citoplasmas presentaban una reacción granular fina y una tinción no demasiado fuerte. No fue raro observar la imagen negativa del aparato de Golgi como un anillo perinuclear y dilataciones cisternales.

Figura R153: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25

Figura R154: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25



En los machos knock out, las células positivas a LH presentaron forma poligonal.

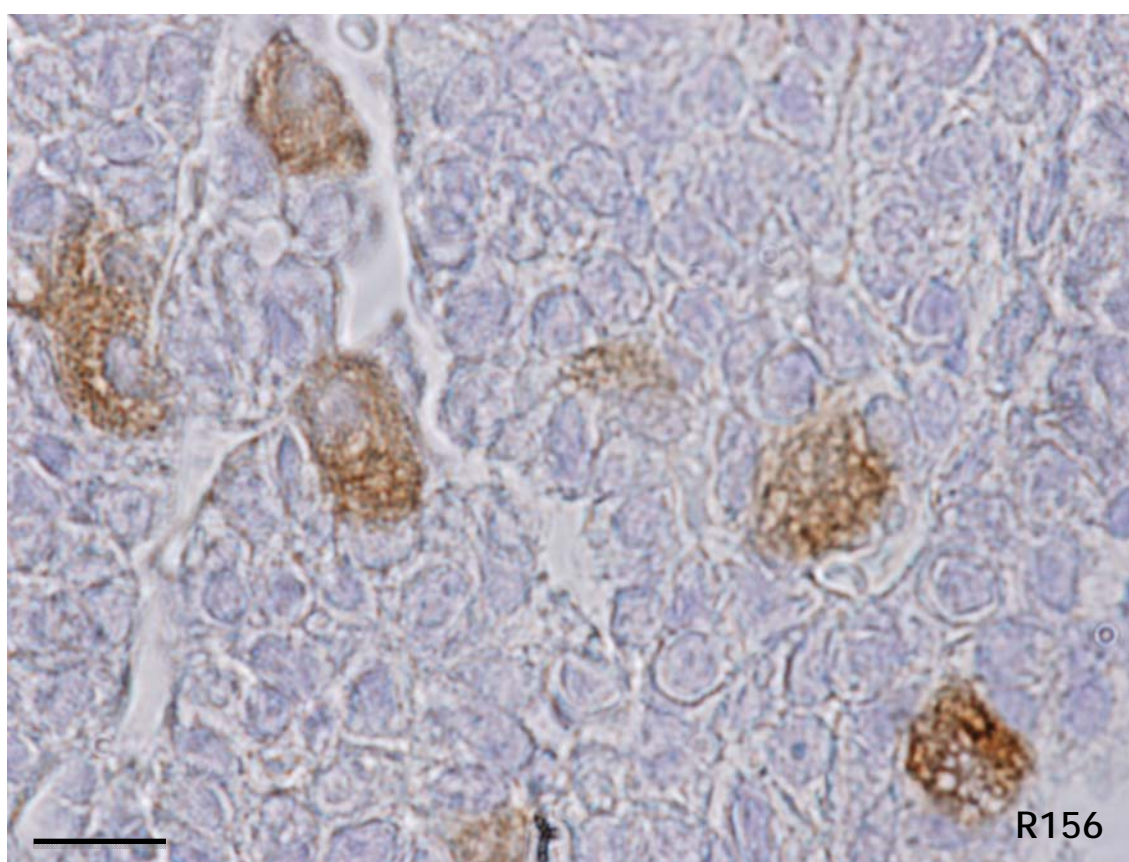
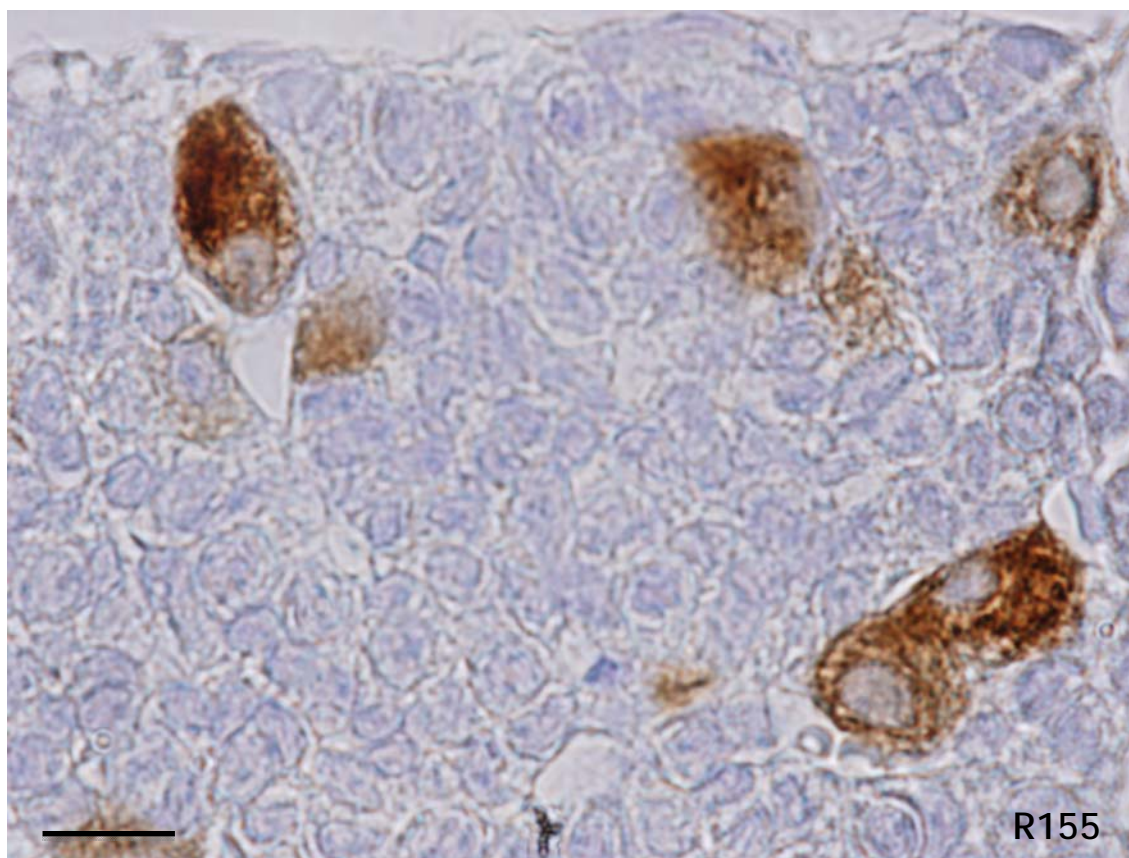
Los núcleos, generalmente excéntricos, eran ovales y sólo en ocasiones aisladas presentaron nucleolo.

El citoplasma presentó una reacción más intensa cuando las células eran superficiales (figura R155), siendo la tinción más leve en las células dispuestas en la profundidad de la región (figura R156).

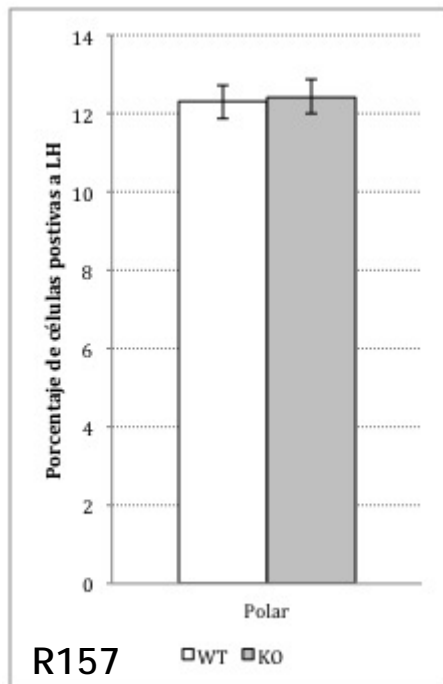
En uno u otro caso, el aspecto cisternal del citoplasma fue manifiesto.

Figura R155: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25

Figura R156: Micrografía de la región lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25



Región Polar (4).



A diferencia de lo que ocurría en las hembras, la región polar de la hipófisis no presentó diferencias significativas en el porcentaje de células positivas a LH entre los machos wild type y los machos knock out (figura R157).

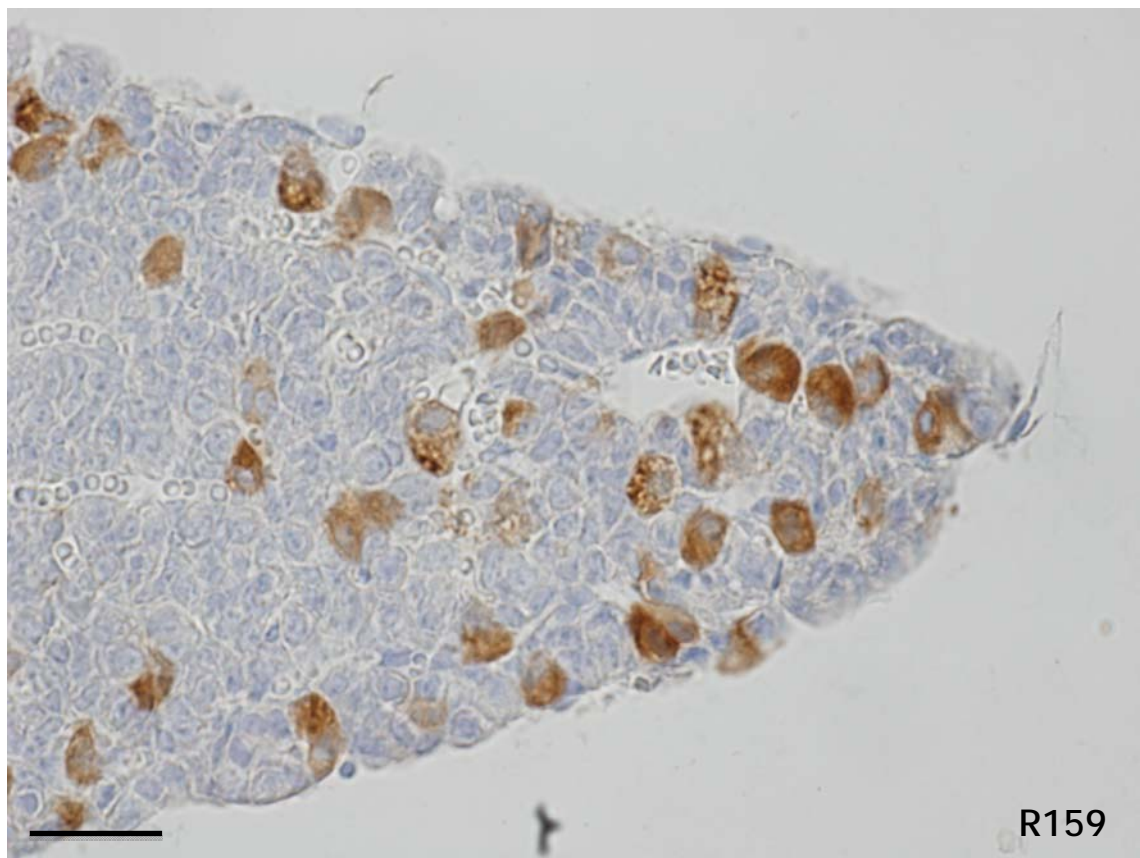
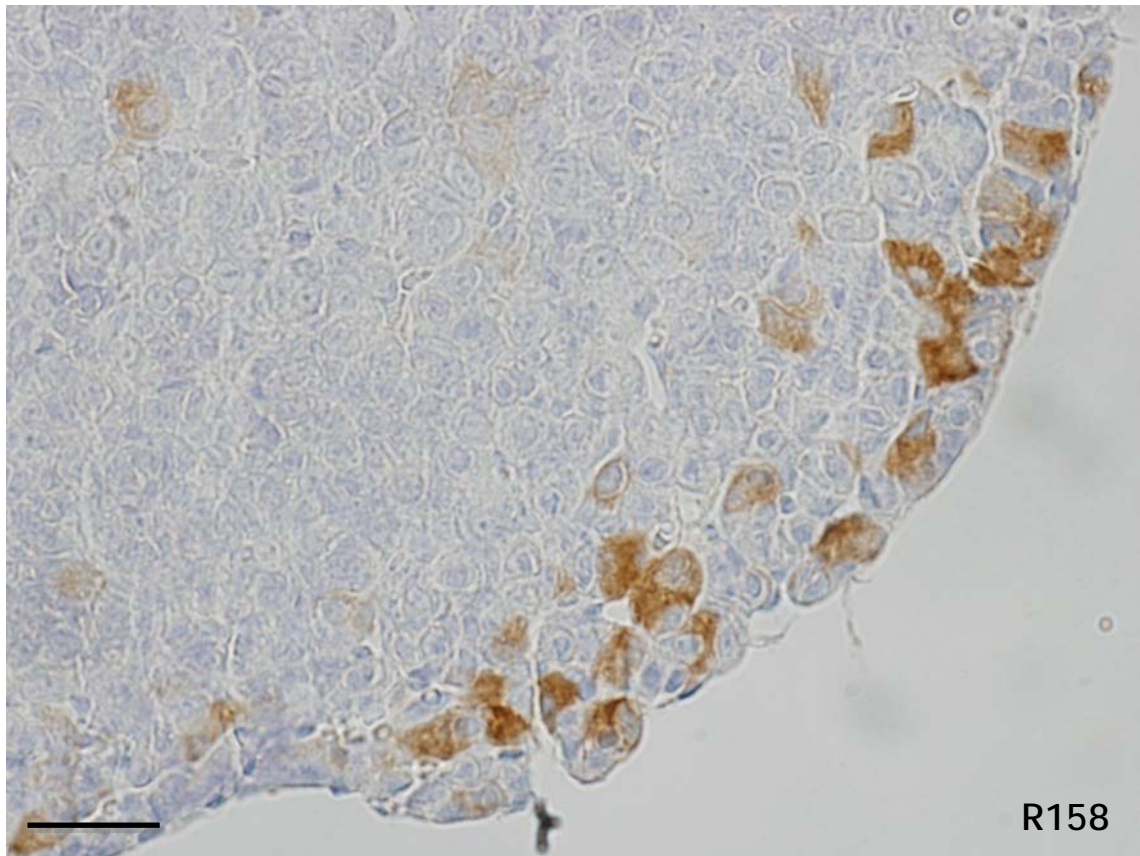
Aunque los machos wild type presentaron un porcentaje mayor y los knock out un porcentaje menor que el observado en las hembras wild type y knock out, estas diferencias no fueron significativas.

En general las células aparecieron dispersas y aisladas (figuras R158 y R159), si bien en ocasiones se observó algún cordón celular de 3 ó 4 células.

Los polos hipofisarios de los machos wild type presentan un patrón característico de agrupación de las células positivas a LH, delimitando bien los márgenes de la glándula y rellenando la parte profunda de la región (figura R159).

Figura R158: Micrografía de la región polar mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50

Figura R159: Micrografía de la región polar mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50



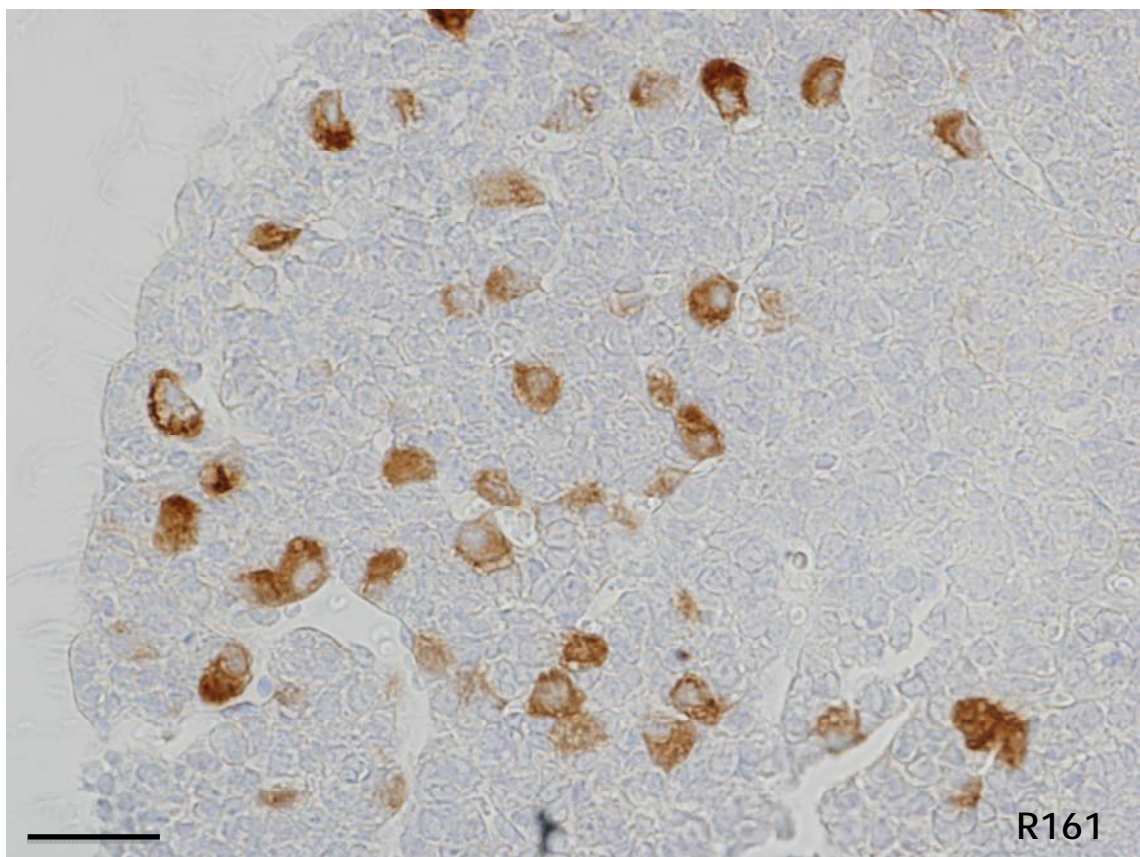
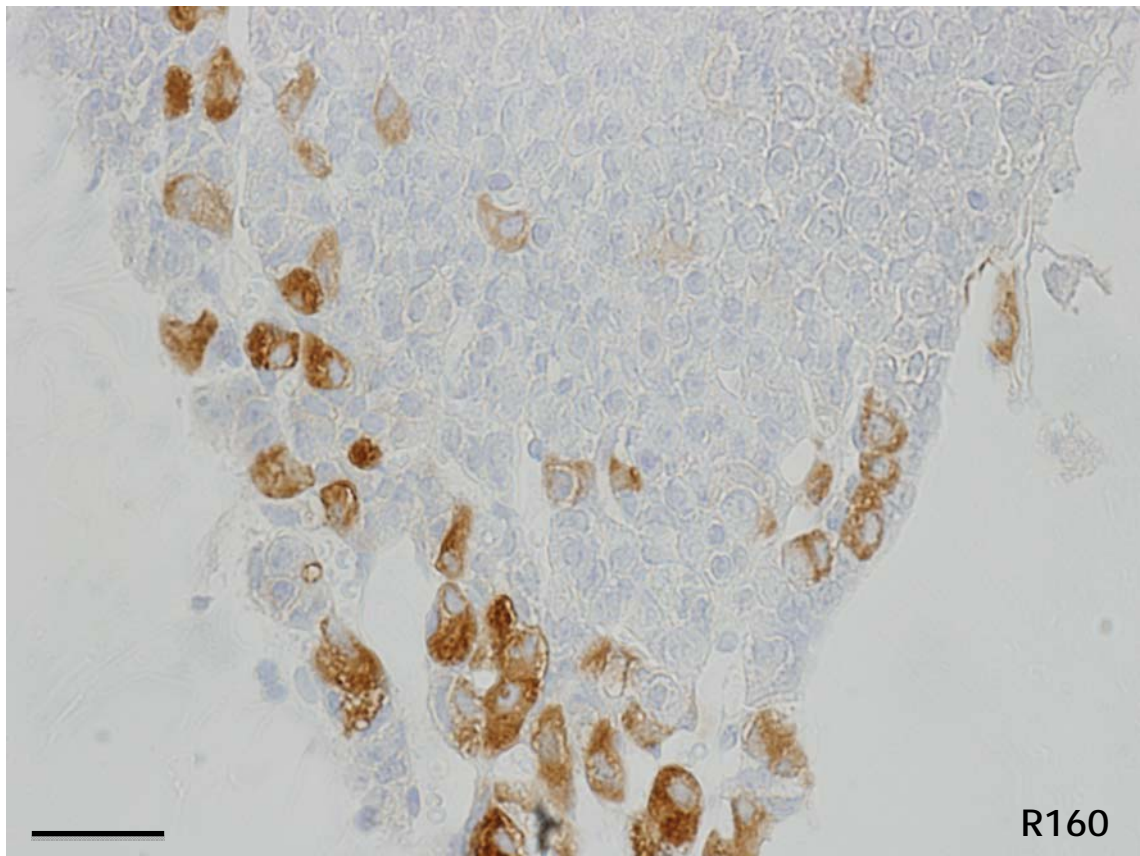
La disposición de las células positivas a LH en la región polar de la hipófisis de los machos knock out fue muy variable de unos animales a otros.

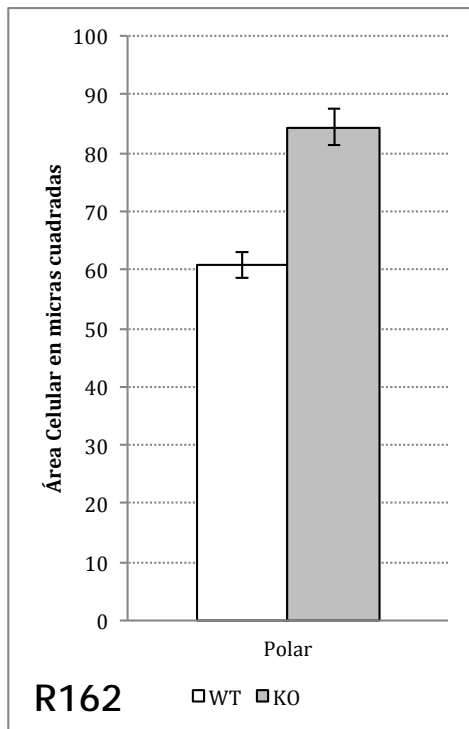
En ocasiones, las células se disponían agrupadas, muy próximas entre sí y en la zona marginal y superficial de la glándula (figura R160).

Otras veces se distribuían por toda la región sin predominar en la zona superficial o en la profunda. Cuando éste era el patrón de distribución, las células aparecieron aisladas y separadas entre sí por células no reactivas (figura R161).

Figura R160: Micrografía de la región polar mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

Figura R161: Micrografía de la región polar mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

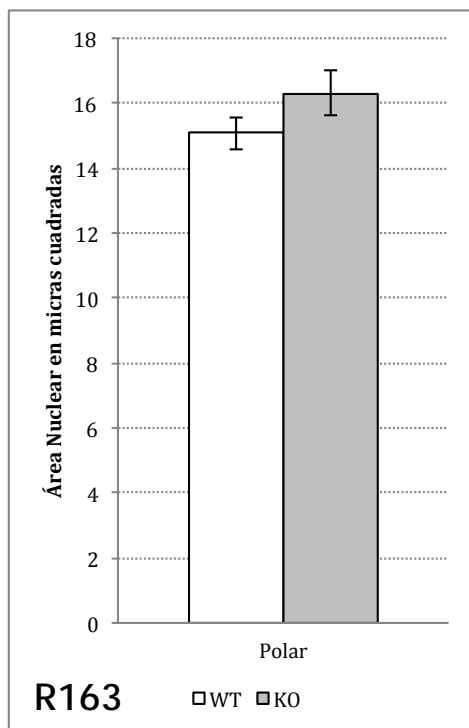




Las células positivas a LH en la región polar de la hipófisis fueron significativamente mayores ($p < 0.01$) en los machos knock out que en los wild type (figura R162).

Los núcleos de estas células no presentaron variaciones significativas entre los dos grupos de animales machos (figura R163).

Comparativamente, los machos wild type presentaron células de menor tamaño que las hembras wild type ($p < 0.05$); mientras que los animales knock out no presentaron diferencias entre machos y hembras.



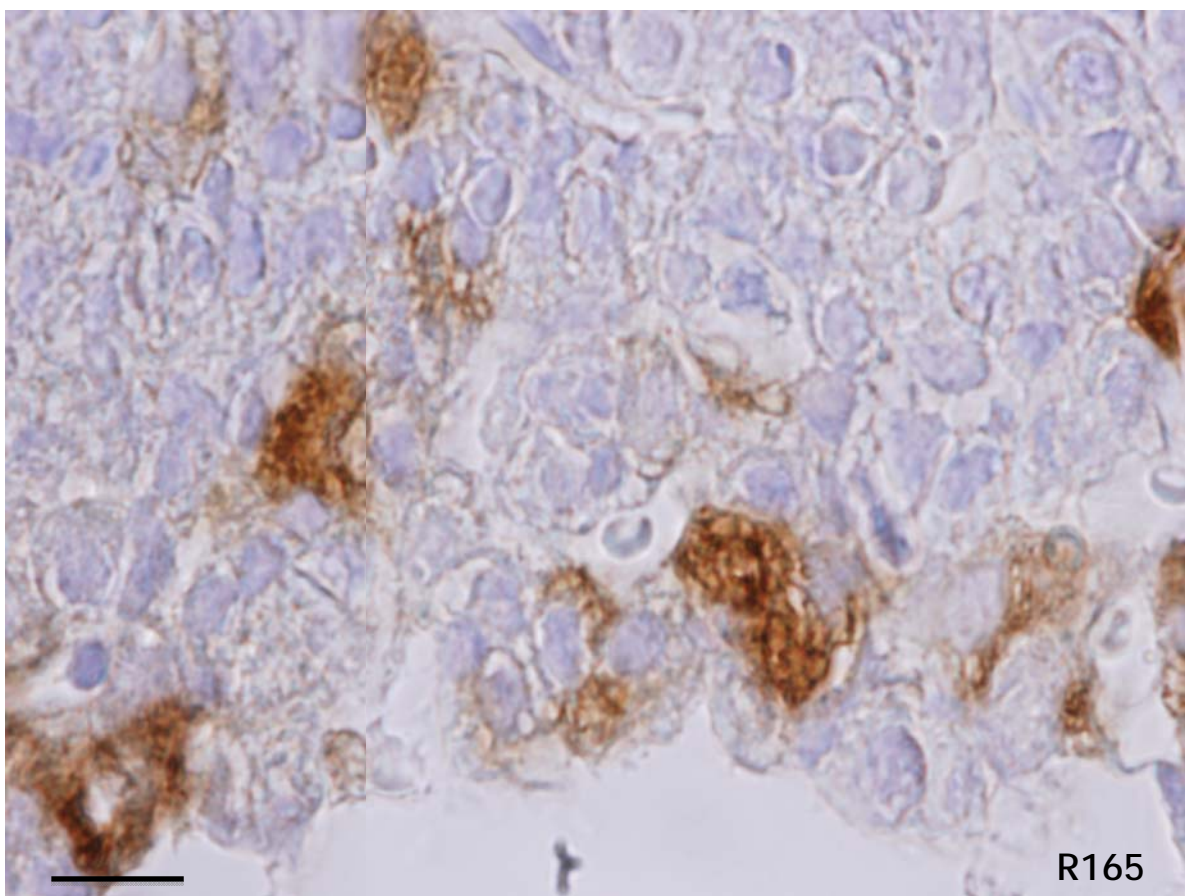
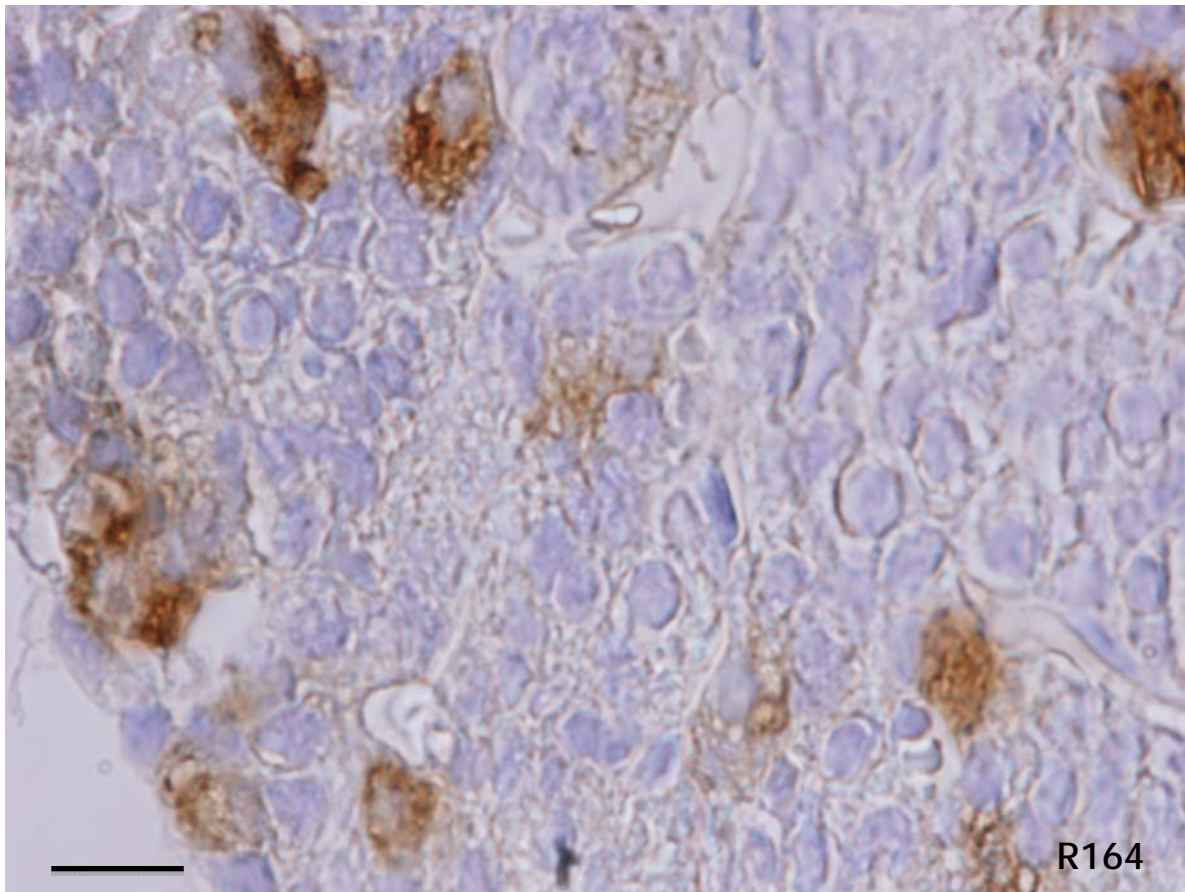
En la región polar, las células positivas a LH de los machos wild type eran poligonales o irregulares.

Sus citoplasmas presentaban reacción granular en el caso de las células débilmente teñidas y con imágenes cisternales en las células intensamente teñidas.

Los núcleos fueron redondos y excéntricos, pero no polarizados vascularmente.

Figura R164: Micrografía de la región polar mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25

Figura R165: Micrografía de la región polar mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25



En los machos knock out, las células positivas a LH aparecían mejor definidas que en los wild type (figuras R166 y R167).

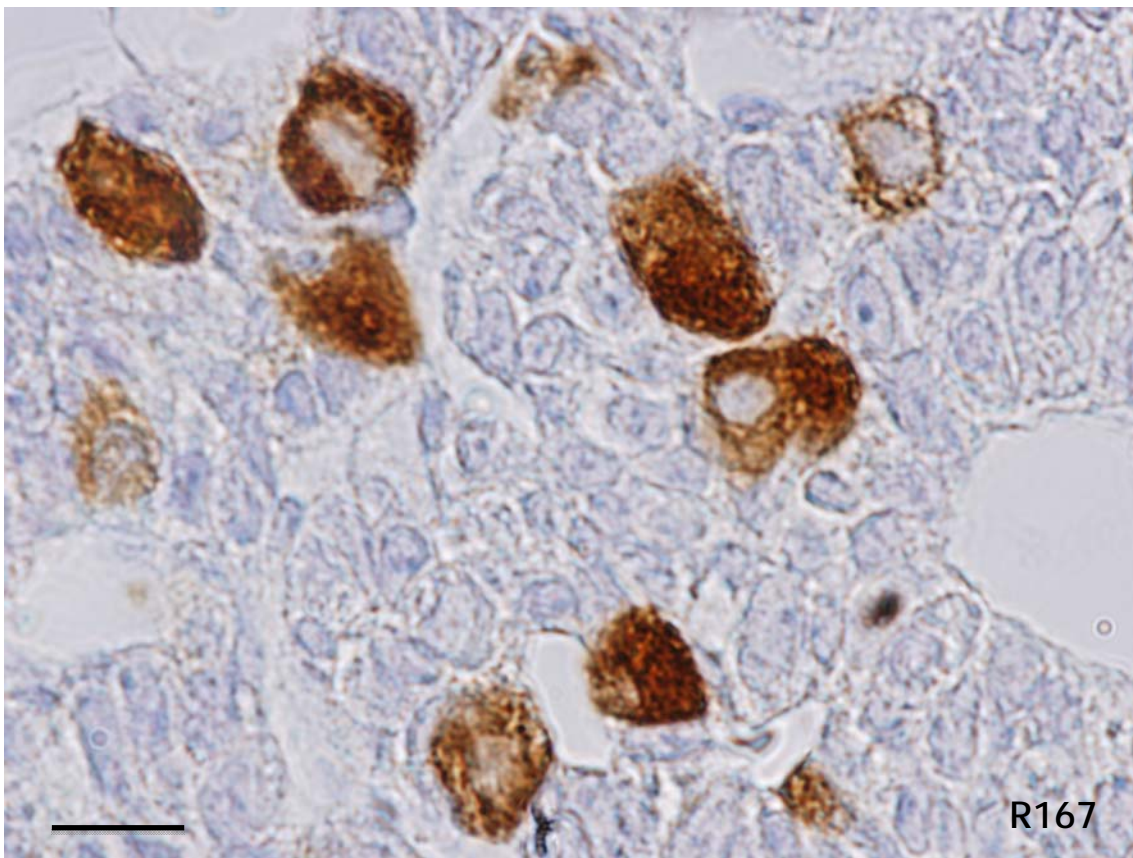
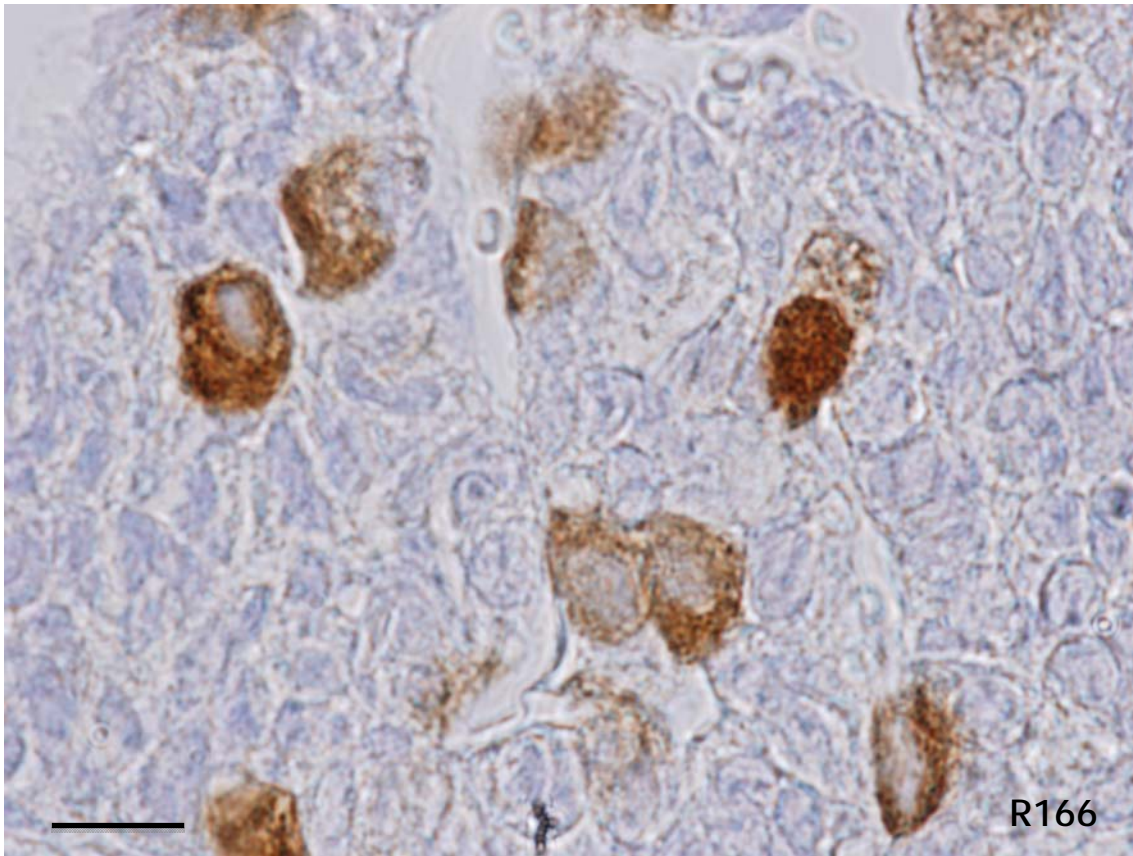
En general fueron células redondeadas o poligonales, asiladas o en pequeños islotes.

Los citoplasmas, de aspecto granular, presentaban una reacción más intensa que la de los wild type. A veces presentaron imagen negativa del aparato de Golgi dispuesta en forma anular en torno al núcleo. Aunque no fue muy frecuente, alguna célula presentó vacuolización del retículo endoplásmico rugoso.

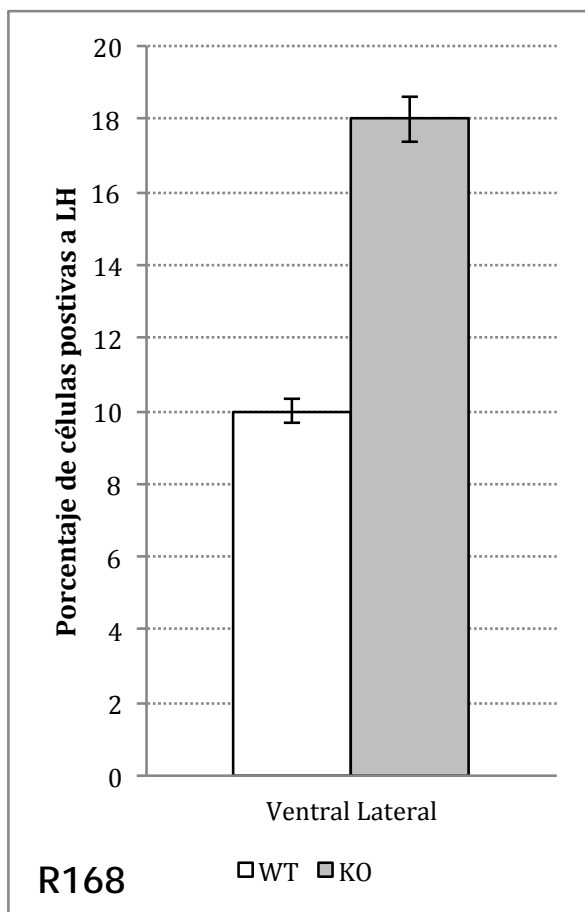
Los núcleos fueron ovalados e hipocromáticos con disposiciones muy variables dentro de la célula.

Figura R166: Micrografía de la región polar mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25

Figura R167: Micrografía de la región polar mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25



Región Ventral Lateral (3).



La región ventral lateral de la hipófisis en los machos wild type presentó muchas menos células positivas a LH que la misma región en las hembras wild type ($p < 0.01$).

Como muestra la figura R168, en los machos knock out, el porcentaje de células positivas a LH en esta región prácticamente se duplicó con respecto a los wild type ($p < 0.005$).

A pesar de este aumento, el número de células positivas a LH fue menor en los machos knock out que en las hembras knock out ($p < 0.01$).

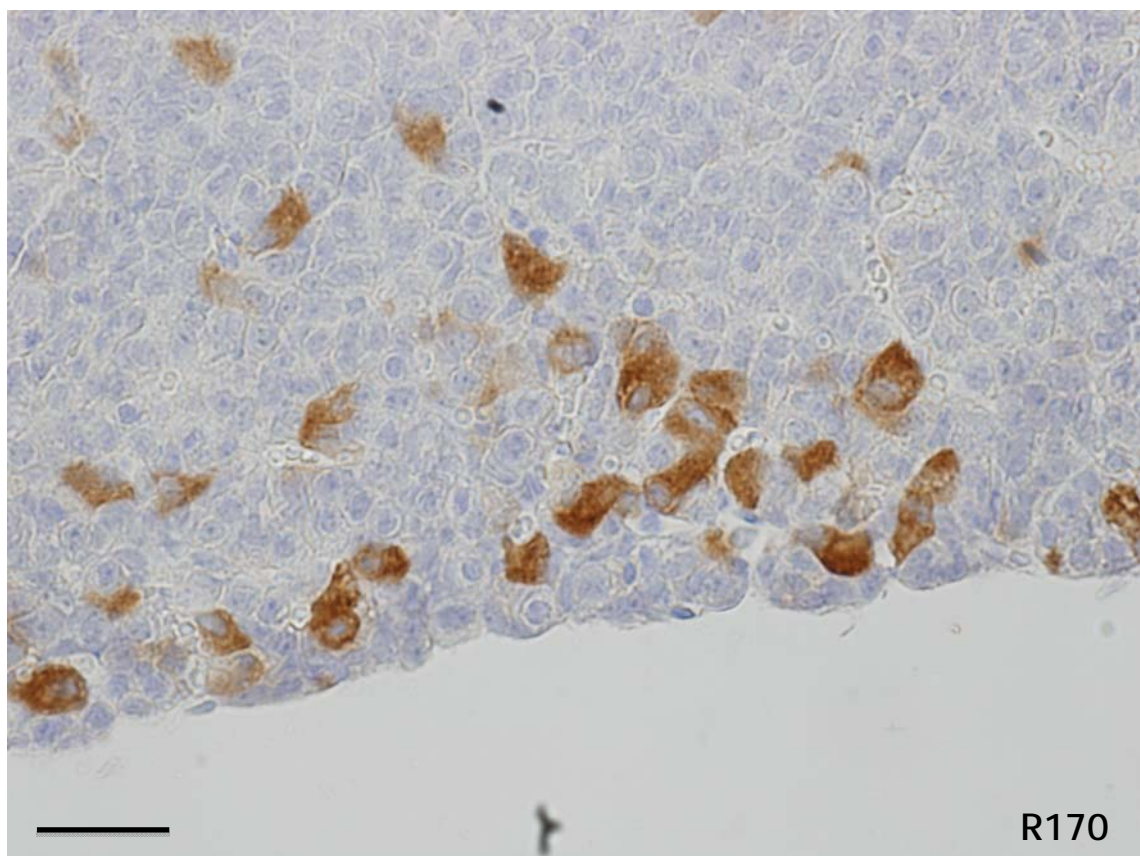
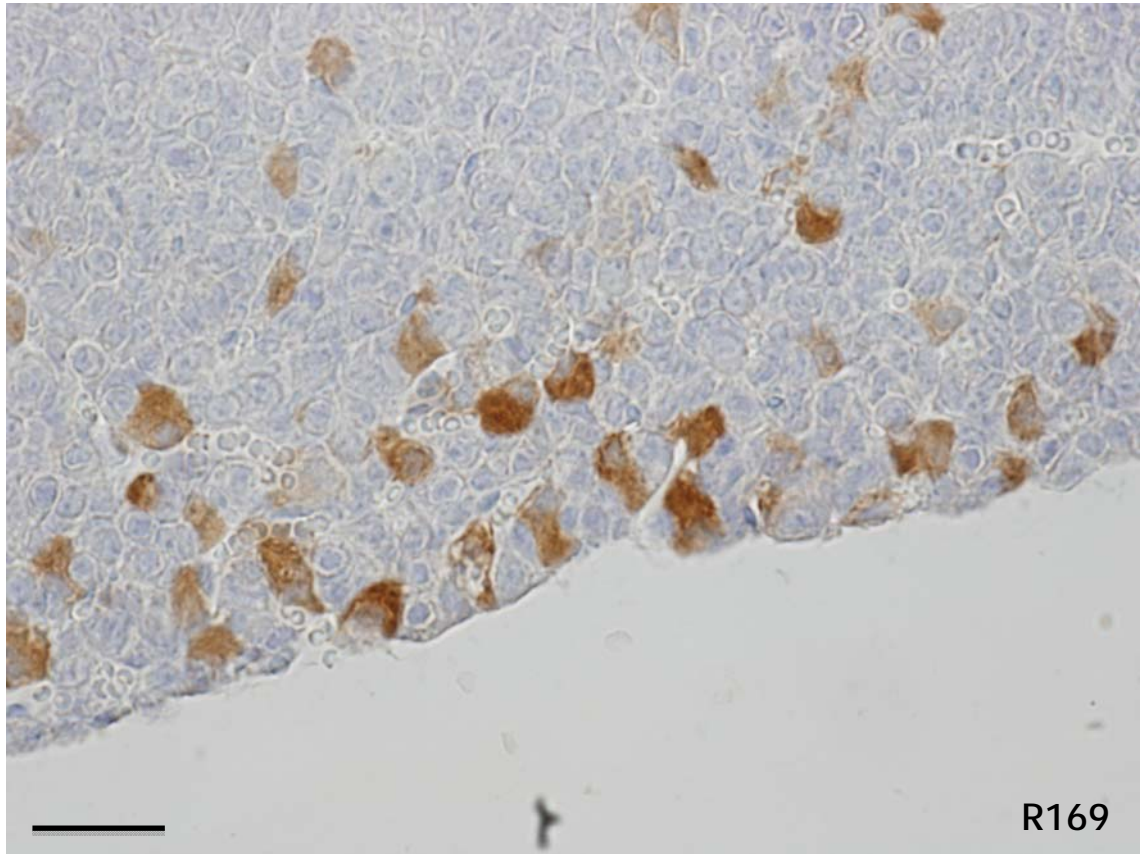
Las células positivas a LH en los animales wild type (figuras R169 y R170) se dispusieron asiladas formando como dos bandas de células paralelas al borde

ventral de la hipófisis.

Aunque había células poco reactivas, la tinción por lo general fue bastante uniforme de unas células a otras.

Figura R169: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50

Figura R170: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50



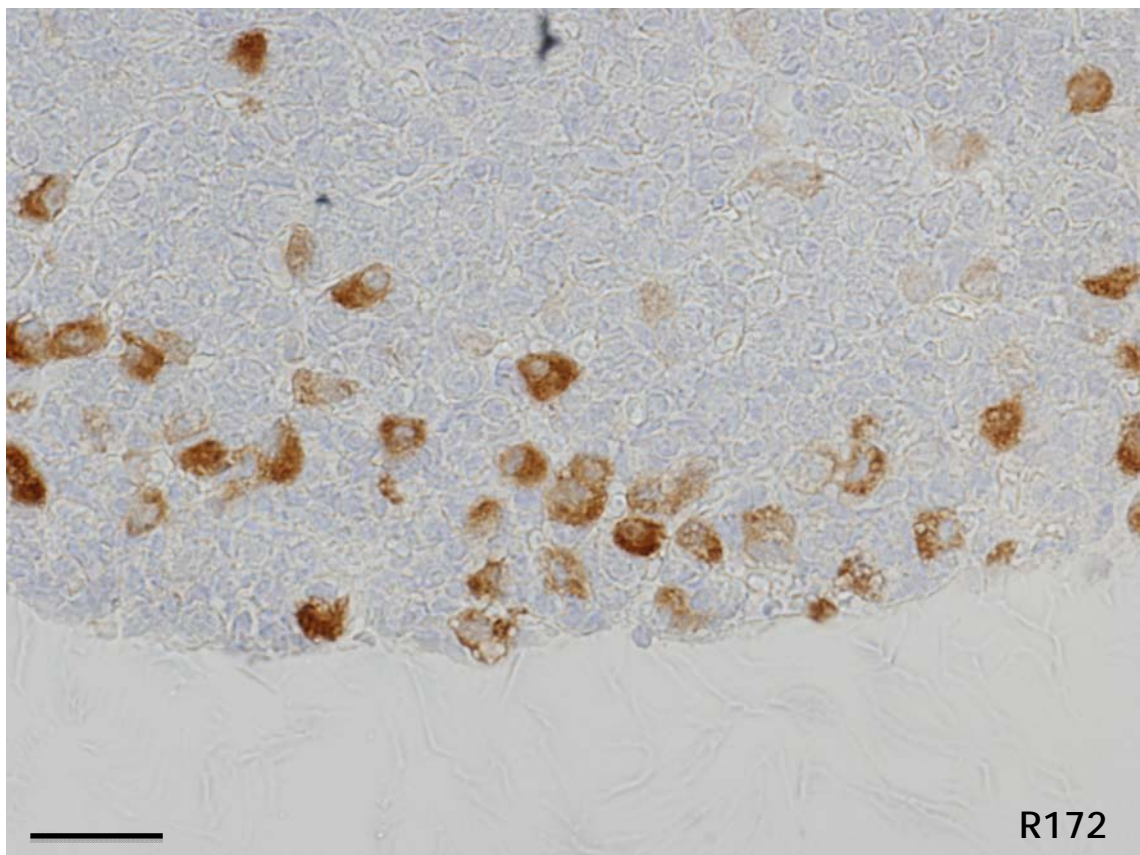
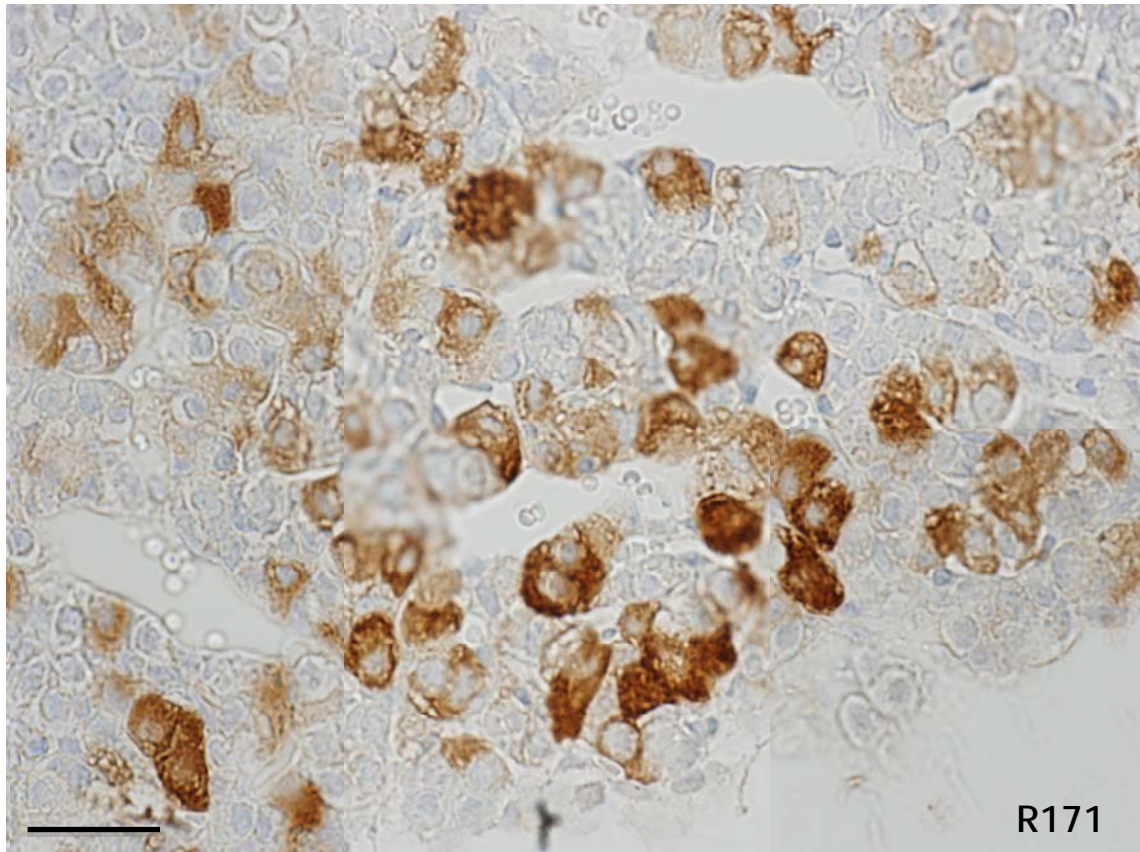
La organización de las células positivas a LH en la región ventral lateral en los animales machos knock out se desestructuró de forma notable (figura R171).

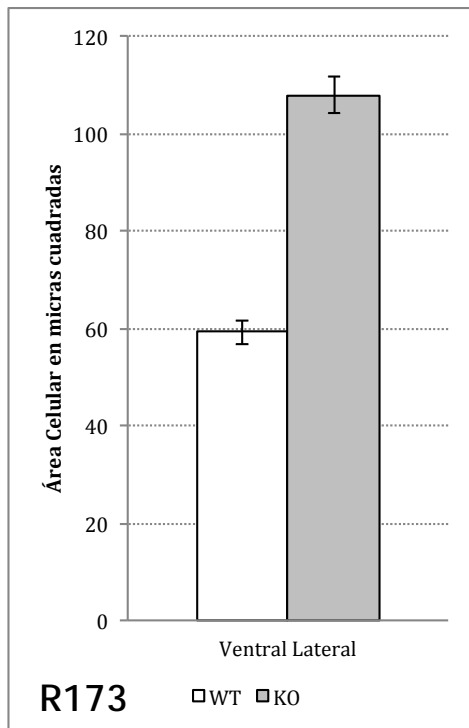
Unos animales (figura R171) no presentaban las bandas celulares típicas de los machos wild type, sino grandes islotes formados por muchas células con mayor o menor intensidad de reacción y agrupados en torno a vasos sanguíneos, por lo general, muy dilatados.

Otros animales presentaron una disposición de sus células dentro de la región parecida a la de los machos wild type, solo que las células no estaban tan aisladas, eran más numerosas, y en vez de una banda celular pudieron observarse hasta 3 ó 4 bandas (figura R172).

Figura R171: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

Figura R172: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

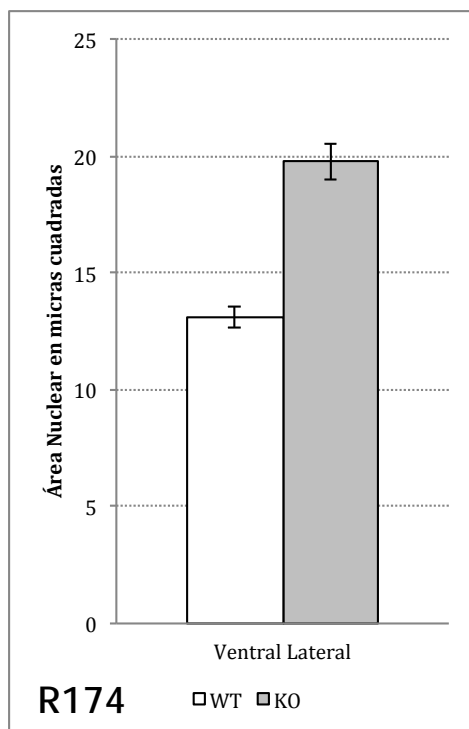




Las células positivas a LH de la región ventral lateral de la hipófisis en los animales knock out fueron significativamente mayores ($p < 0.01$) que las observadas en los machos wild type (figura R173).

Algo muy similar ocurrió al analizar el tamaño de sus núcleos (figura R174).

Tampoco hubo diferencias significativas al comparar estas células entre hembras y machos wild type, mientras que si las hubo al analizar los animales knock out en los que los machos presentaron células de mayor tamaño que las hembras ($p < 0.5$).



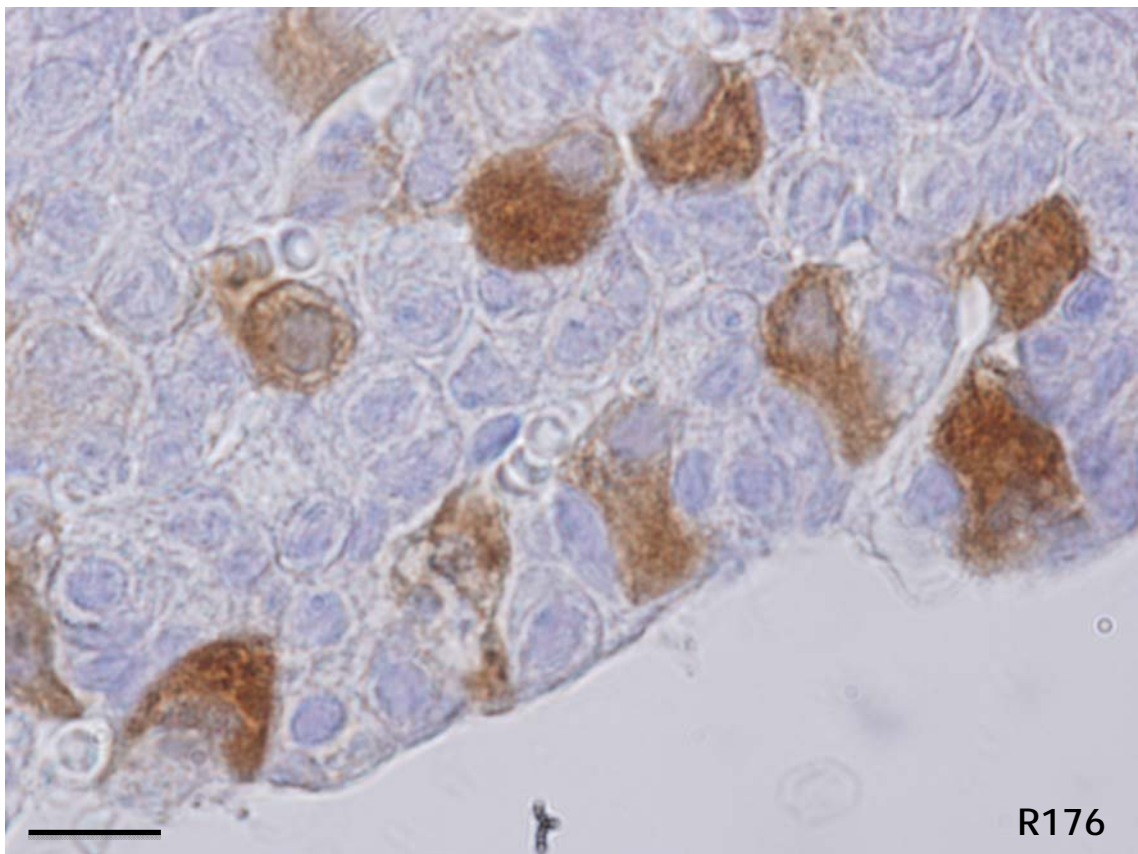
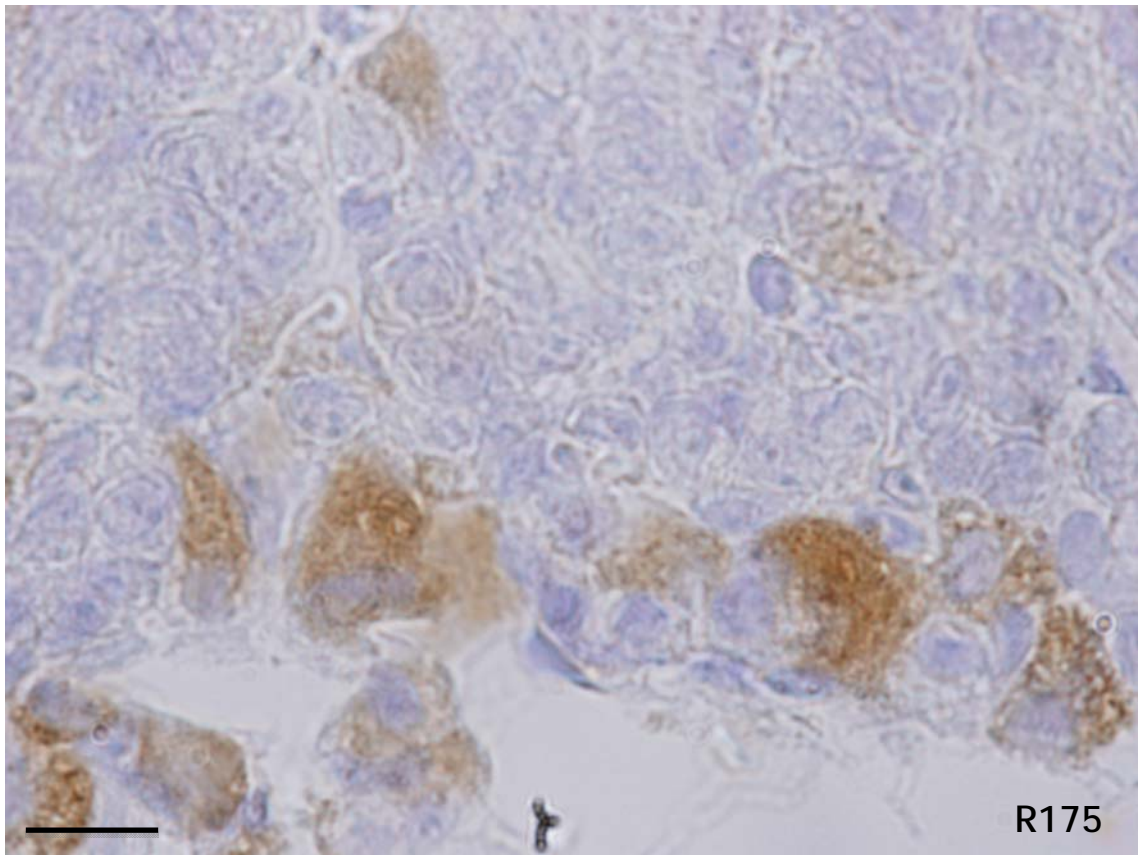
Las células presentaron una reacción granular medianamente intensa que afectaba a todo el citoplasma, si bien algunas células tenían vacuolizaciones cisternales.

Como muestran las figuras R175 y R176, la morfología de estas células fue muy variable. En ocasiones presentaban prolongaciones gruesas hacia los vasos, otras eran poligonales, otras casi circulares.

Los núcleos eran excéntricos, redondos u ovalados, bien teñidos con la hematoxilina y sin nucléolos.

Figura R175: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25

Figura R176: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25



En los machos knock out, las células aparecían intensamente teñidas y muy cambiantes en su forma (figuras R177 y R178).

Los citoplasmas presentaban reacción en su totalidad de tipo granular grueso.

Fue frecuente observar dos o tres dilataciones cisternales de retículo endoplásmico rugoso dispuestas por debajo de la membrana celular.

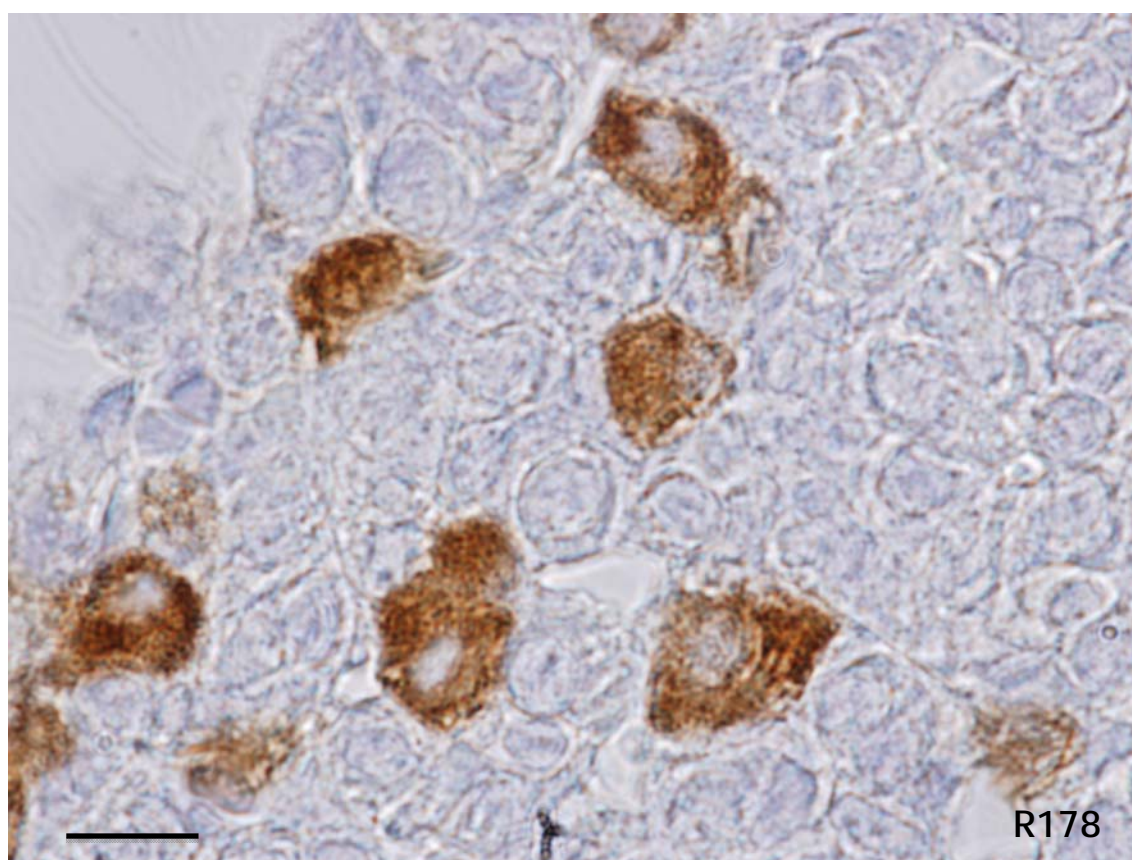
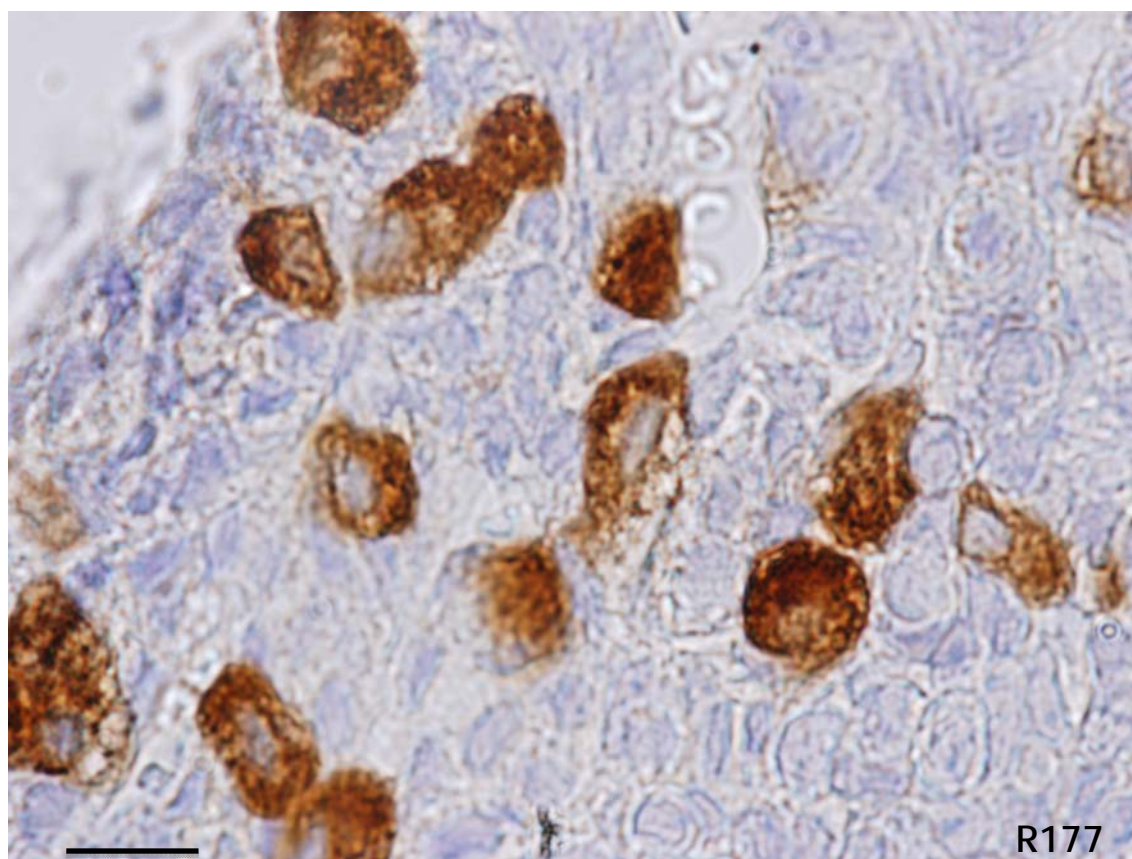
También fue muy frecuente encontrar la imagen negativa del aparato de Golgi yuxtannuclear.

Los núcleos generalmente ovalados no presentaban un patrón definido de localización dentro de la célula.

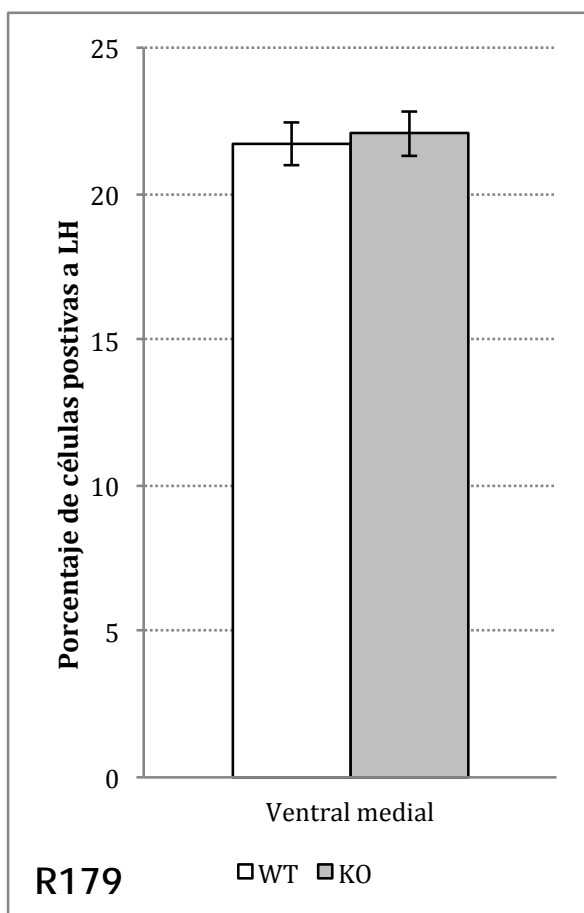
No abundaban las células con prolongaciones citoplásmicas y las que había tenía prolongaciones pequeñas poco destacables.

Figura R177: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25

Figura R178: Micrografía de la región ventral lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25



Región Ventral Medial (2).



El porcentaje de células positivas a LH en la región ventral medial de la hipófisis en los machos wild type fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que el observado en la región ventral lateral de estos mismo animales y que el observado en la región ventral medial de las hembras wild type ($p < 0.05$).

Estas diferencias no se observaron al comparar los animales knock out.

Entre los machos wild type y los knock out, como se aprecia en la figura R179, no aparecieron diferencias significativas.

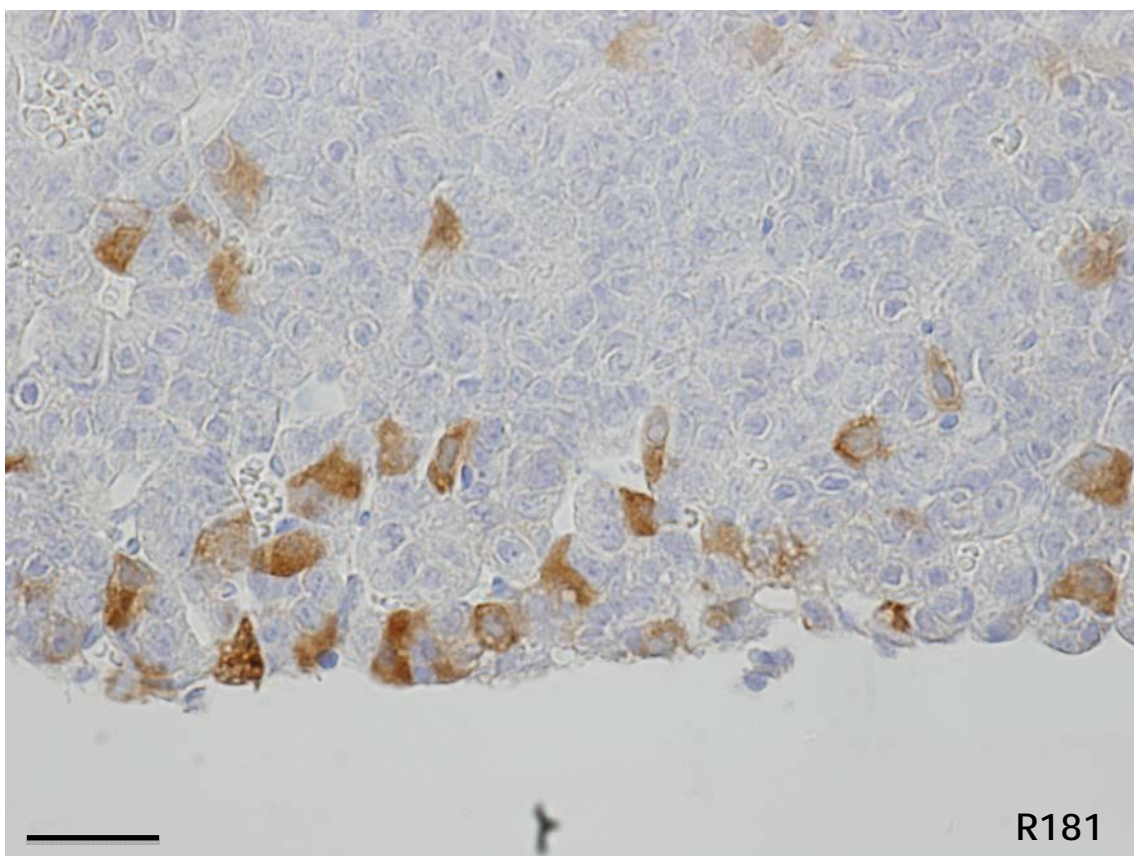
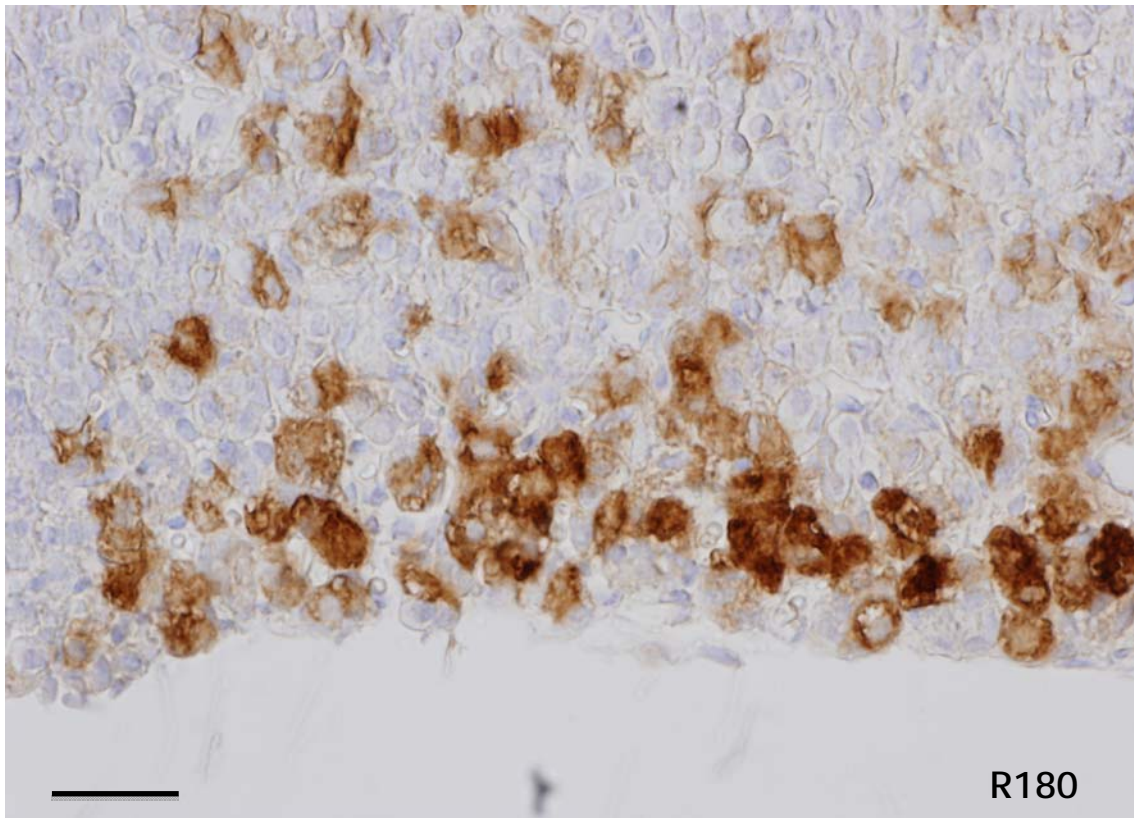
Las células positivas a LH de esta región en los machos wild type fueron muy variables de unos animales a otros (comparar figu-

ras R180 y R181).

Mientras que algunos animales mantenían la estructura en bandas de la región ventral lateral (figura R181), en otro animales las células formaban grupos compactos de células muy reactivas (figura R180).

Figura R180: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50

Figura R181: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50



En los machos knock out, las diferencias entre animales también apareció, aunque algo menos marcada que en las hembras.

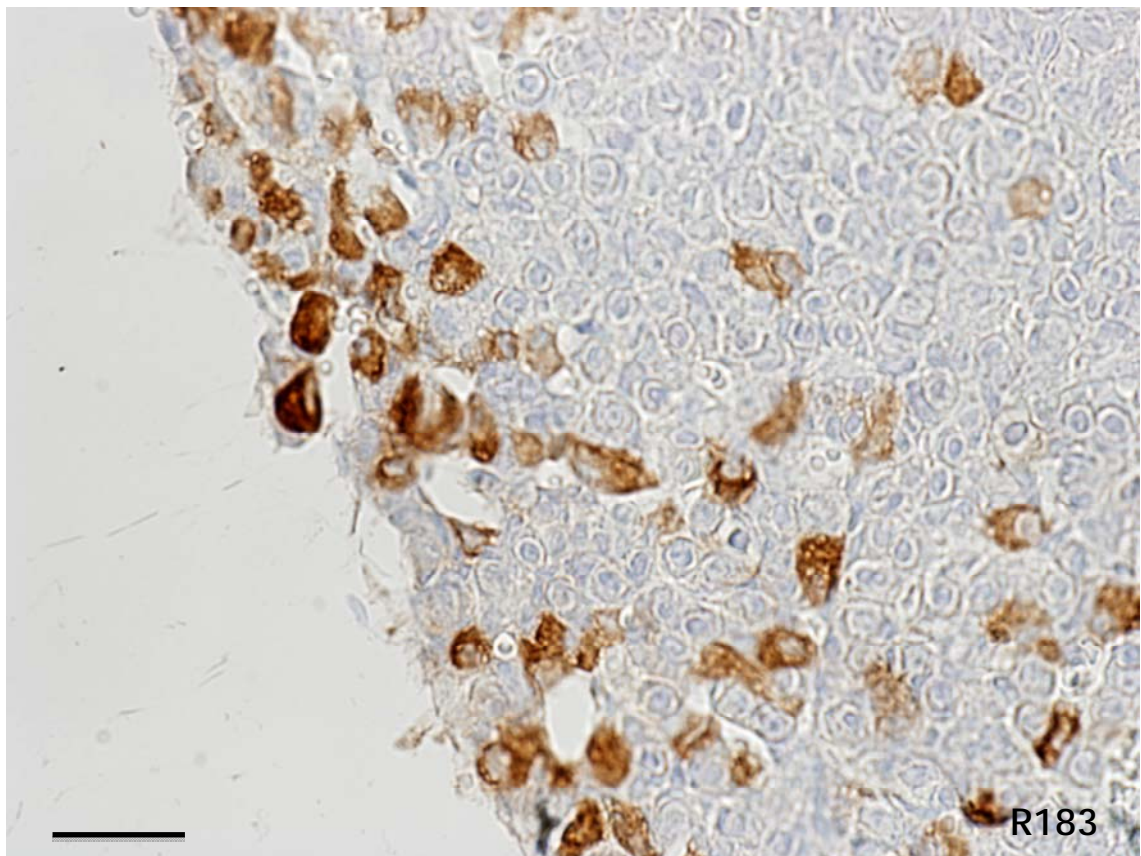
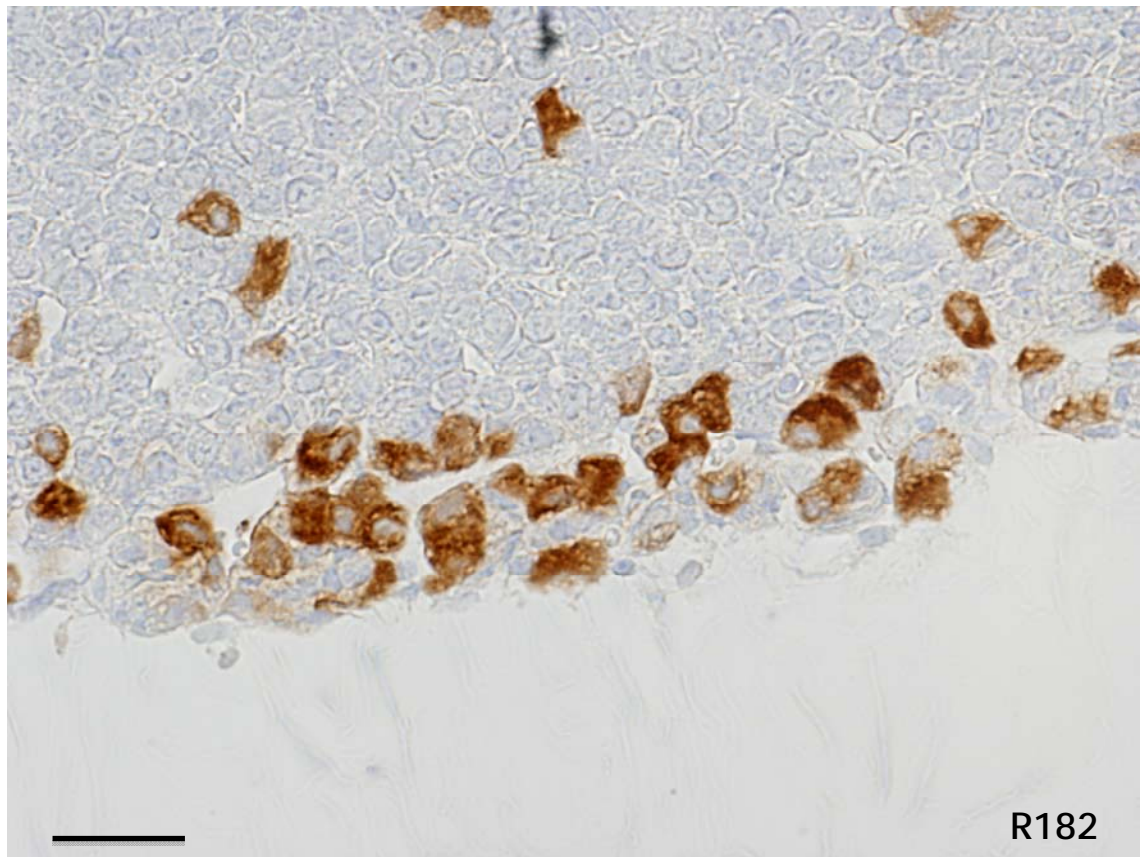
Todos los animales presentaron una banda muy ventral bien definida formada por 3 ó 4 estratos celulares paralelos al borde ventral de la hipófisis (figuras R182 y R183).

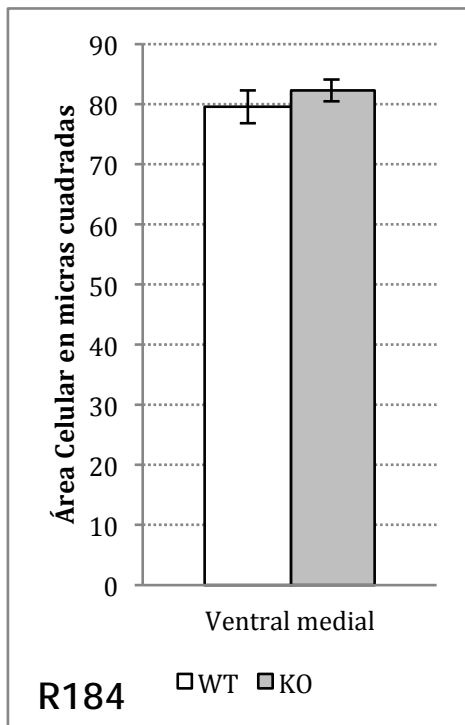
Las diferencias se establecieron en las células que desde la periferia glandular se disponían hacia el centro de la glándula, aproximándose a la región central medial.

En unos animales habían pocas células, quedando amplios espacios desprovistos de células positivas (figura R182), mientras que en otros esta zona presentaba muchas células positivas dispersas y aisladas (figura R183).

Figura R182: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

Figura R183: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

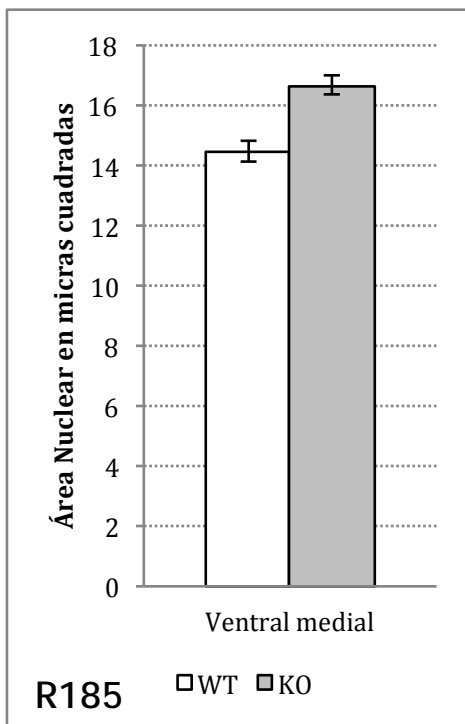




Al igual que ocurría con el porcentaje celular, en la región ventral medial de los machos no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las células o de sus núcleos (figuras R184 y R185).

Tampoco aparecieron diferencias significativas al comparar el tamaño de las células de esta región entre machos y hembras, ya fueran wild type o knock out.

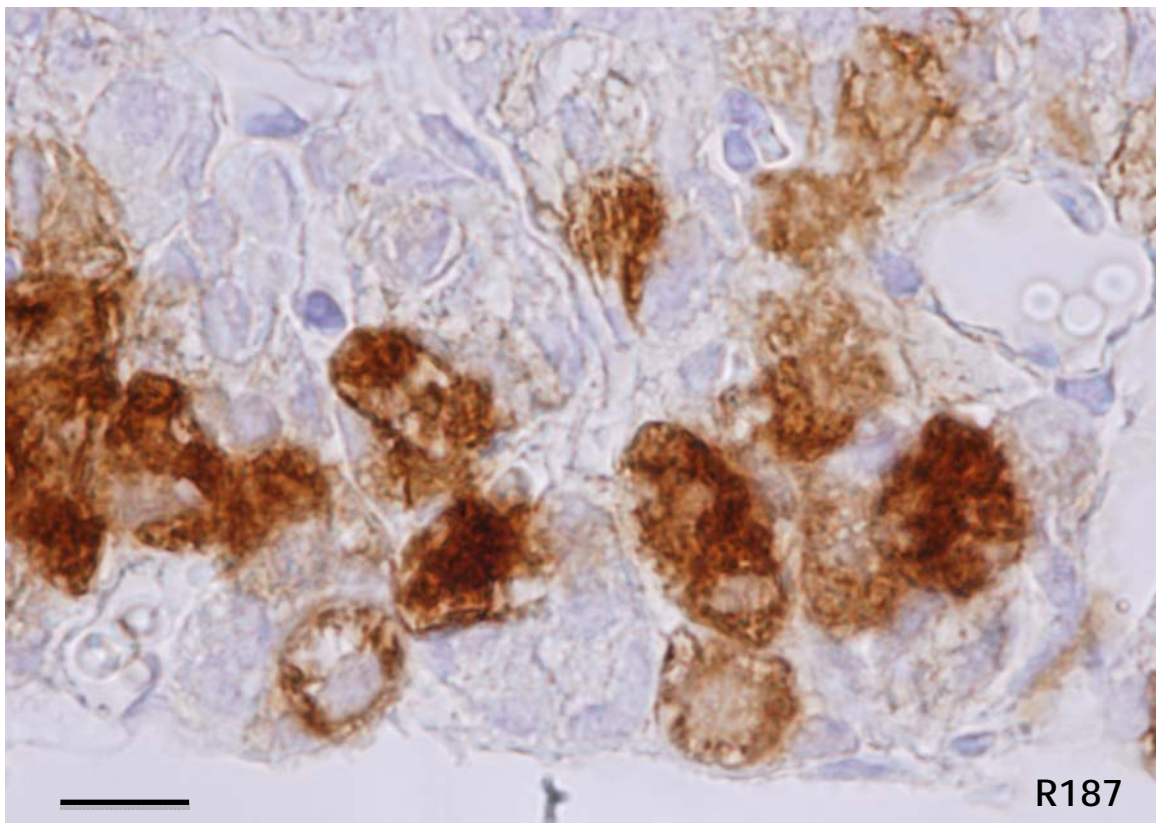
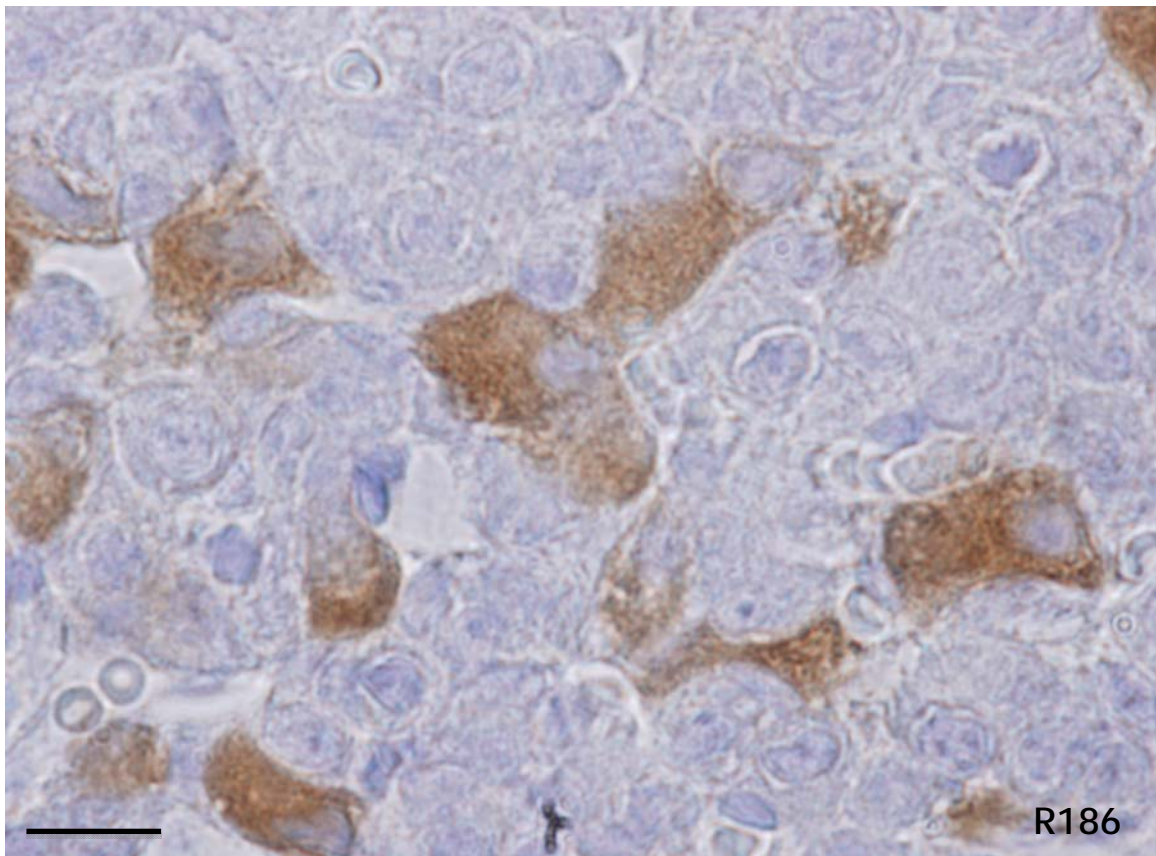
La variabilidad que describimos antes de unos animales a otros, a pequeños aumentos, se hace aún más evidente al analizar a grandes aumentos las células positivas a LH de esta región en los machos wild type.



Algunos animales presentaron células muy parecidas a las observadas en la región ventral lateral (figura R186). Mientras que otros presentaron células intensamente reactivas, poligonales o redondeadas, con un citoplasma de aspecto reticular (figura R187).

Figura R186: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25

Figura R187: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25



En los machos knock out, a diferencia de los wild type, las variaciones se produjeron sólo en la distribución de las células dentro de la región, ya que las células positivas a LH fueron muy semejantes de unos animales a otros (figuras R188 y R189).

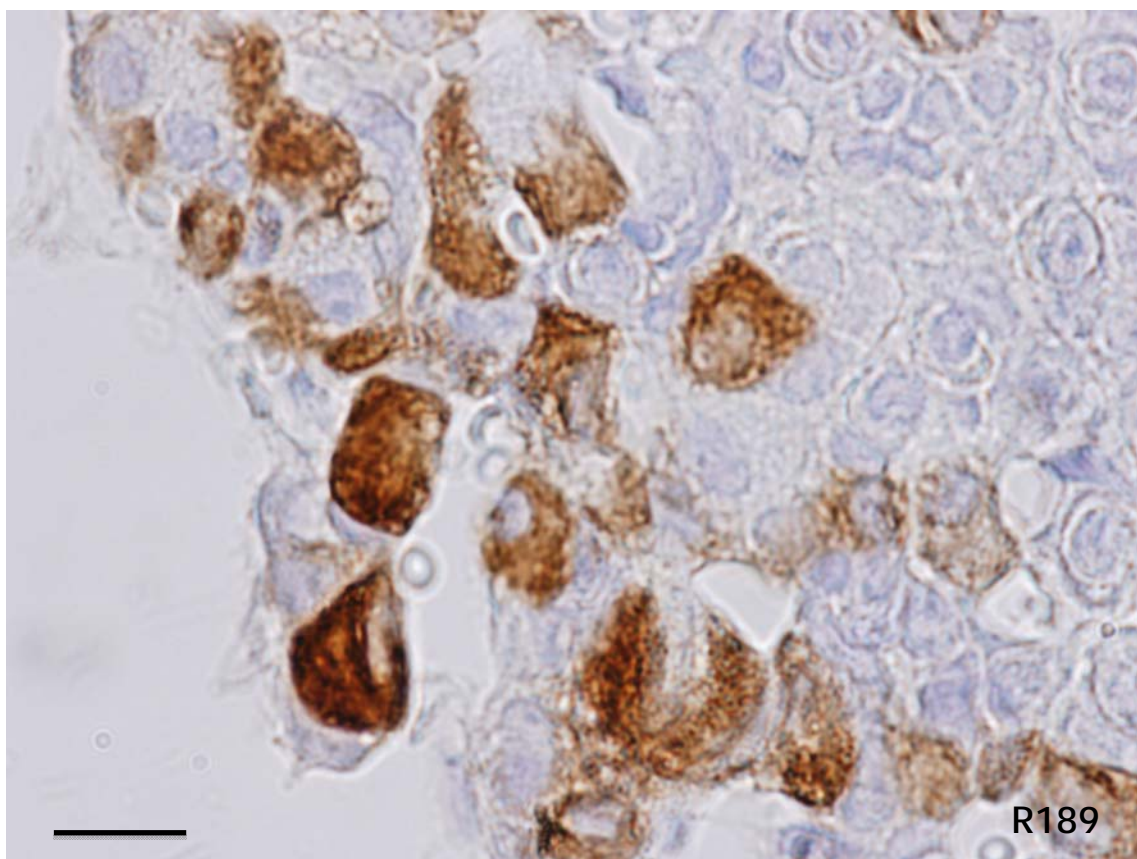
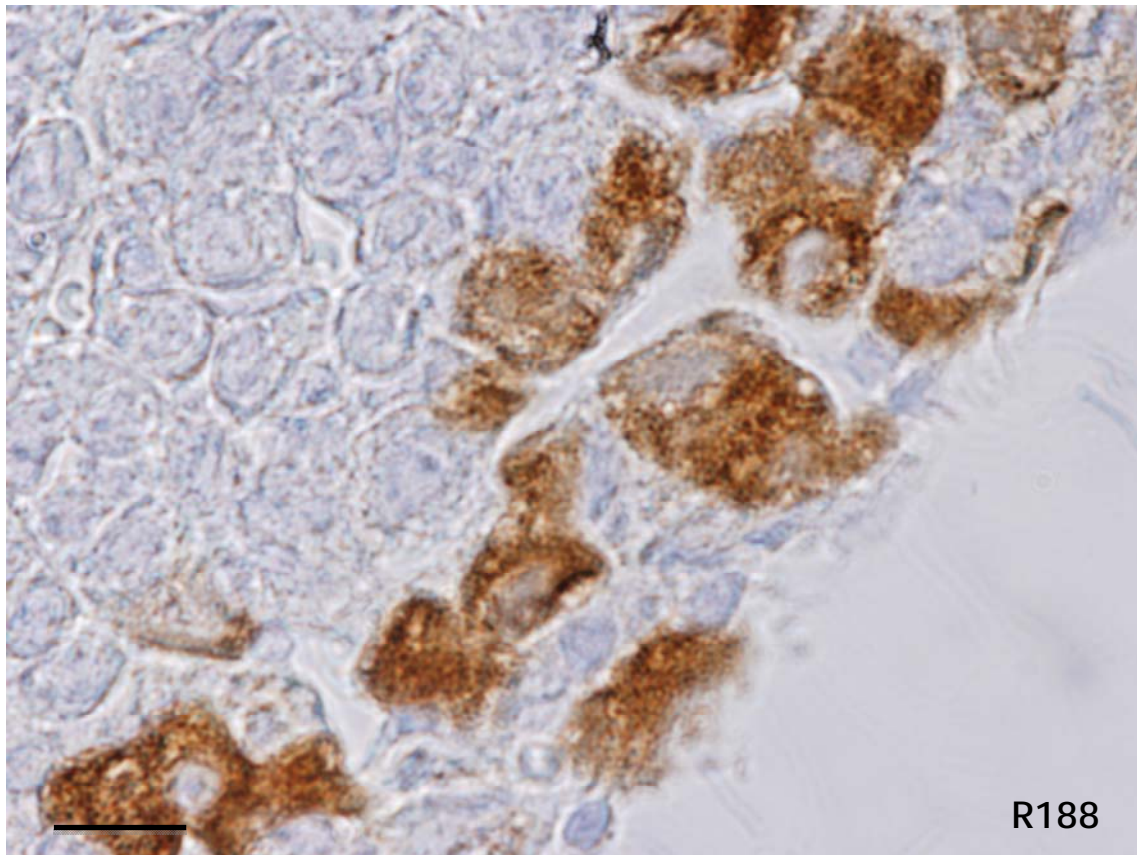
La mayoría fueron células poligonales, de núcleo oval y excéntrico.

Los citoplasmas aparecían de aspecto granular grueso, mostrando en muchas ocasiones la imagen negativa del aparato de Golgi.

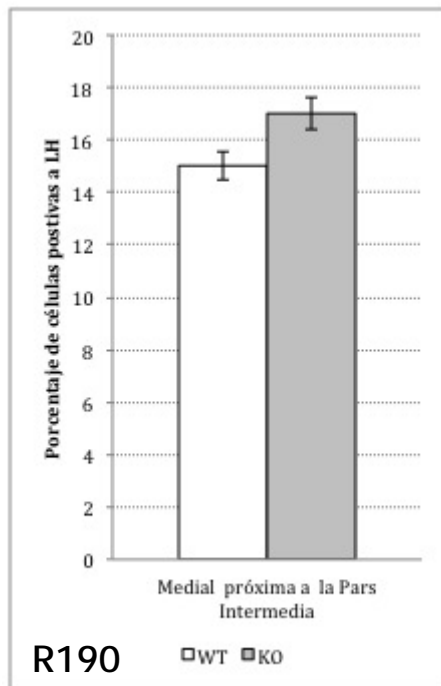
Algunas células presentaron prolongaciones citoplásmicas hacia los vasos sanguíneos o bien eran células en copa englobando a otra célula no reactiva.

Figura R188: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25

Figura R189: Micrografía de la región ventral medial mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25



Región Medial próxima a la Pars Intermedia (9).



Aunque, en esta región, los machos knock out presentaron un porcentaje de células mayor que el de los wild type, las diferencias observadas no fueron significativas (figura R190).

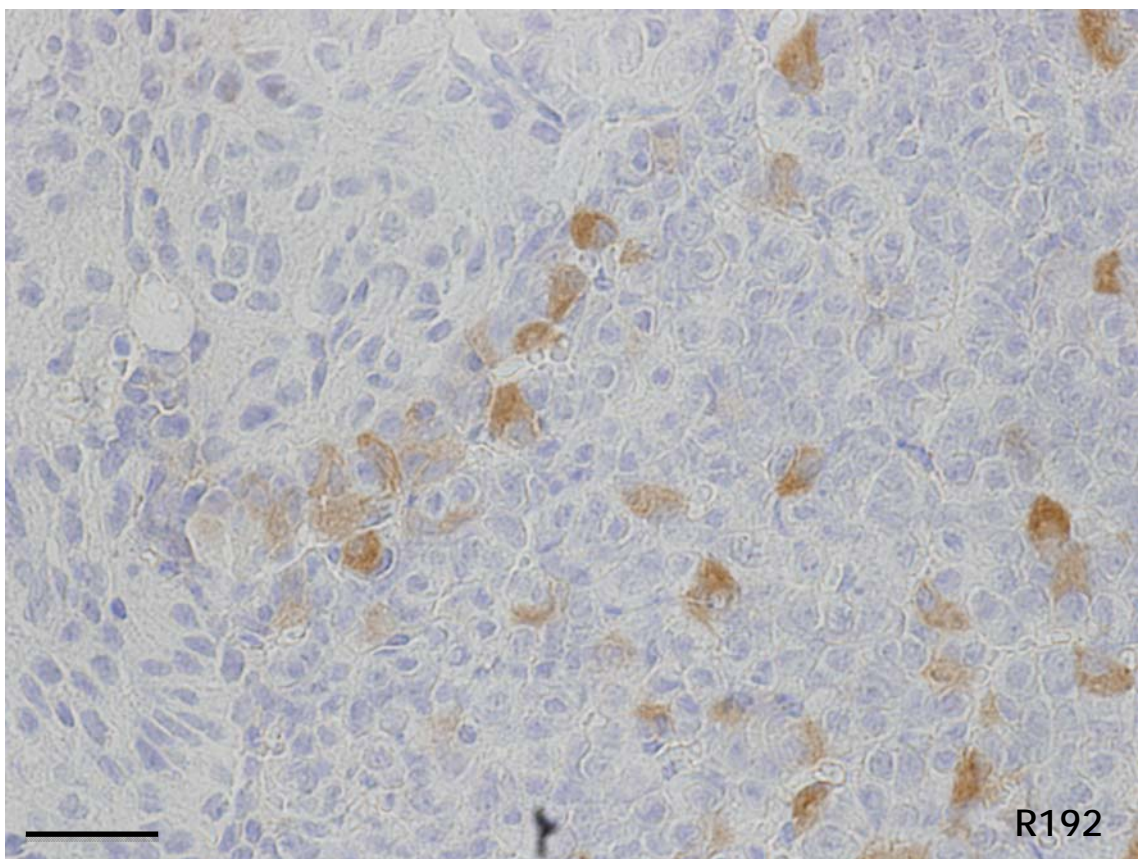
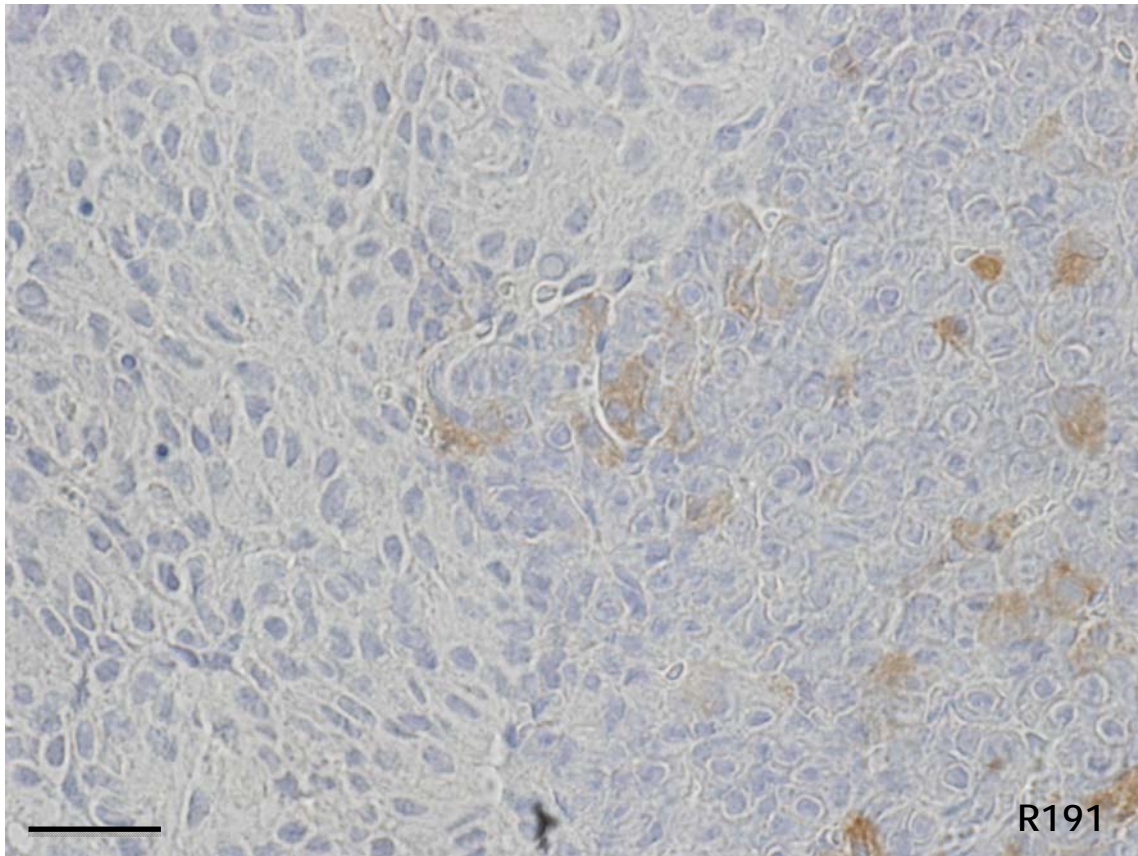
Las células positivas a LH de esta región en los machos wild type presentaron una intensidad de reacción baja (figuras R191 y R192).

Aparecieron dispersas por la región y generalmente aisladas.

Aunque se podía apreciar células en el límite vecino a la pars intermedia, nunca se apreció que invadieran esta parte de la hipófisis.

Figura R191: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50

Figura R192: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50



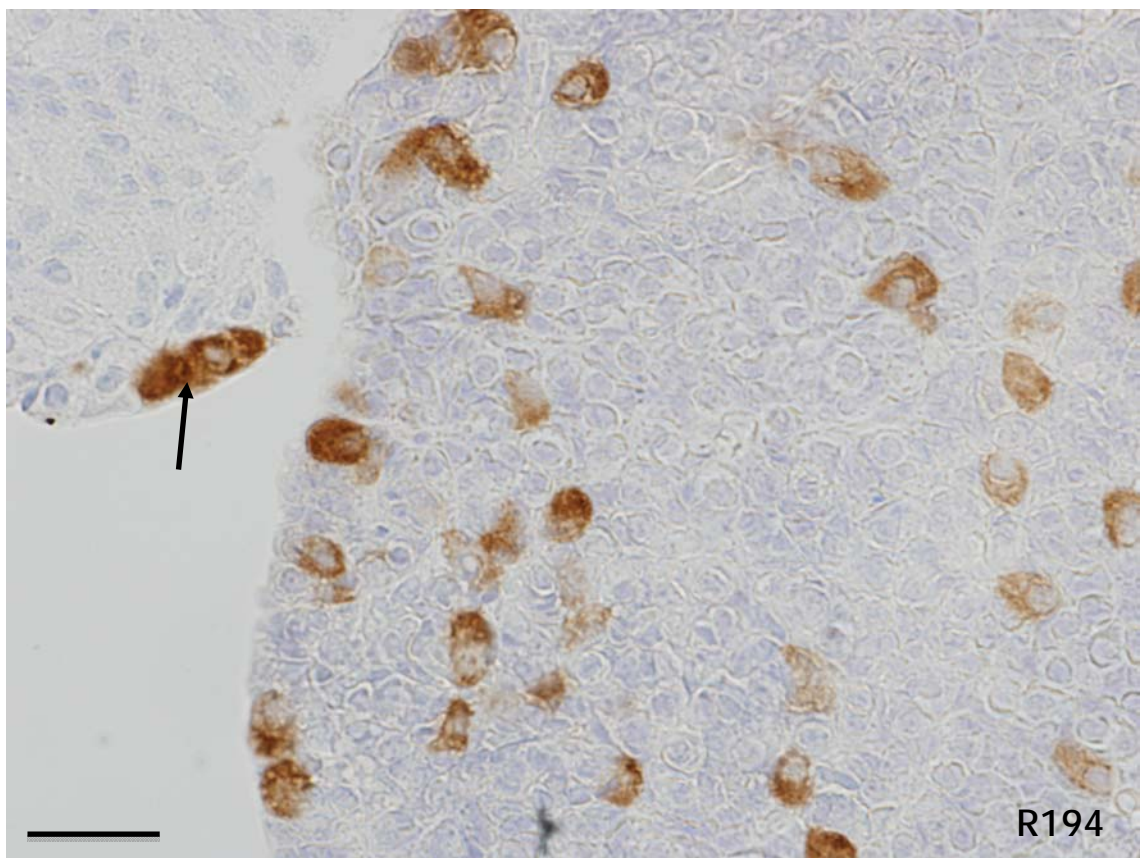
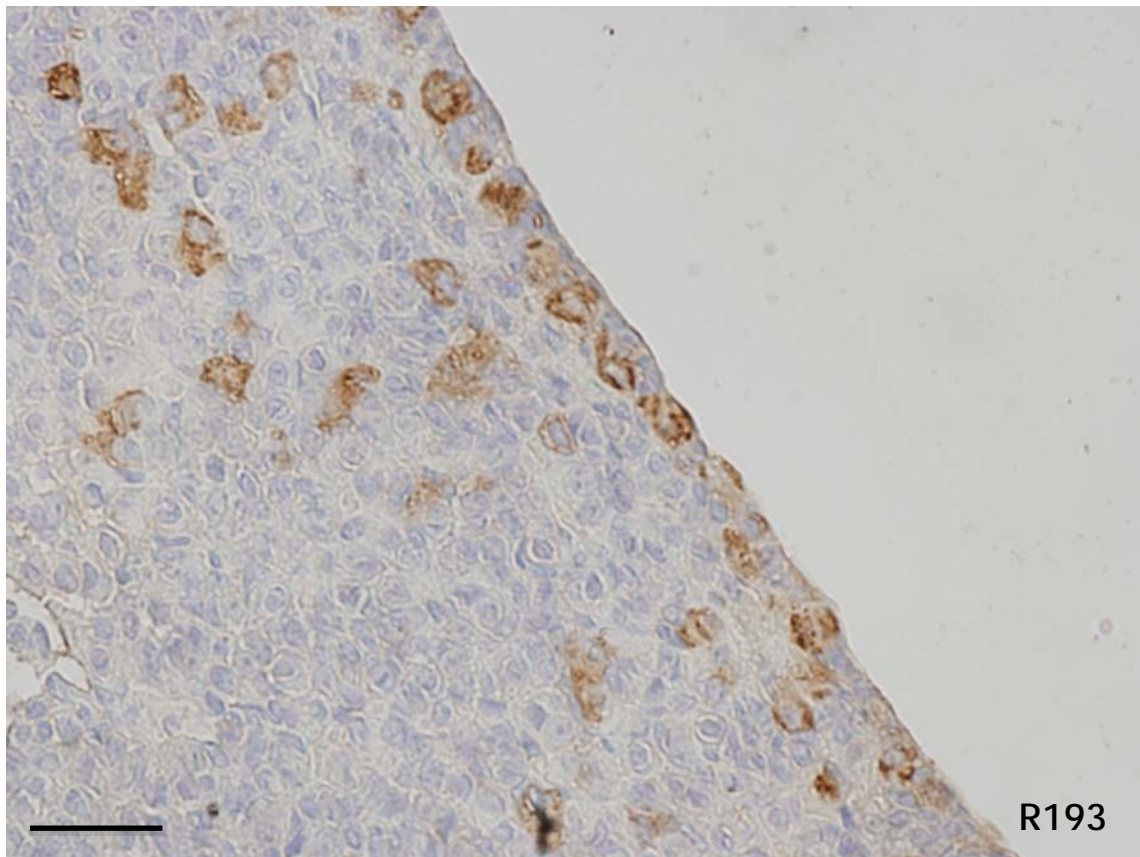
En los machos knock out, la región medial próxima a la pars intermedia (o a la caverna hipofisaria) se tiñeron más intensamente que las de los animales wild type (figuras R193 y R194).

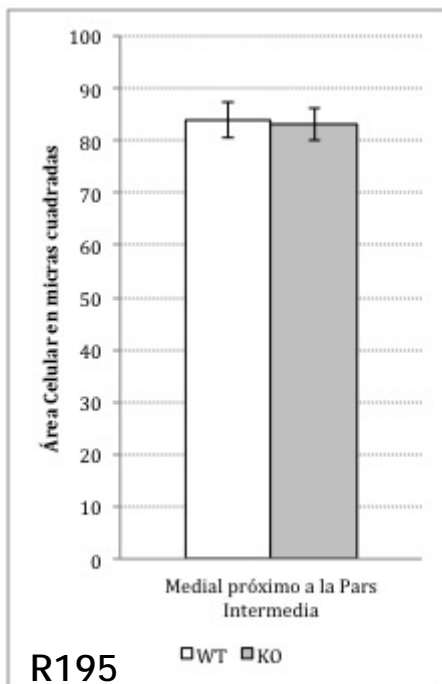
Casi siempre formaban un cordón celular continuo o casi continuo que contactaba con la luz de la caverna (figura R193), el resto de la región presentaba células aisladas y dispersas por toda ella (figuras R193 y R194).

En estos animales, en ocasiones se observó la presencia de pequeños islotes o cordones formados por 4 ó 5 células que invadían la pars intermedia y se situaban al lado contrario de la caverna hipofisaria (flecha en figura R194).

Figura R193: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

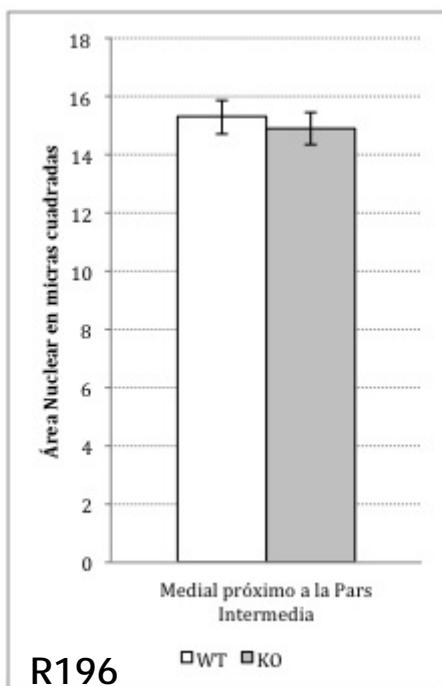
Figura R194: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50





El estudio morfométrico de las células positivas a LH en esta región puso de manifiesto que ni el área celular ni el área nuclear presentaban variaciones significativas de tamaño de los machos wild type con respecto a los machos knock out (figuras R195 y R196).

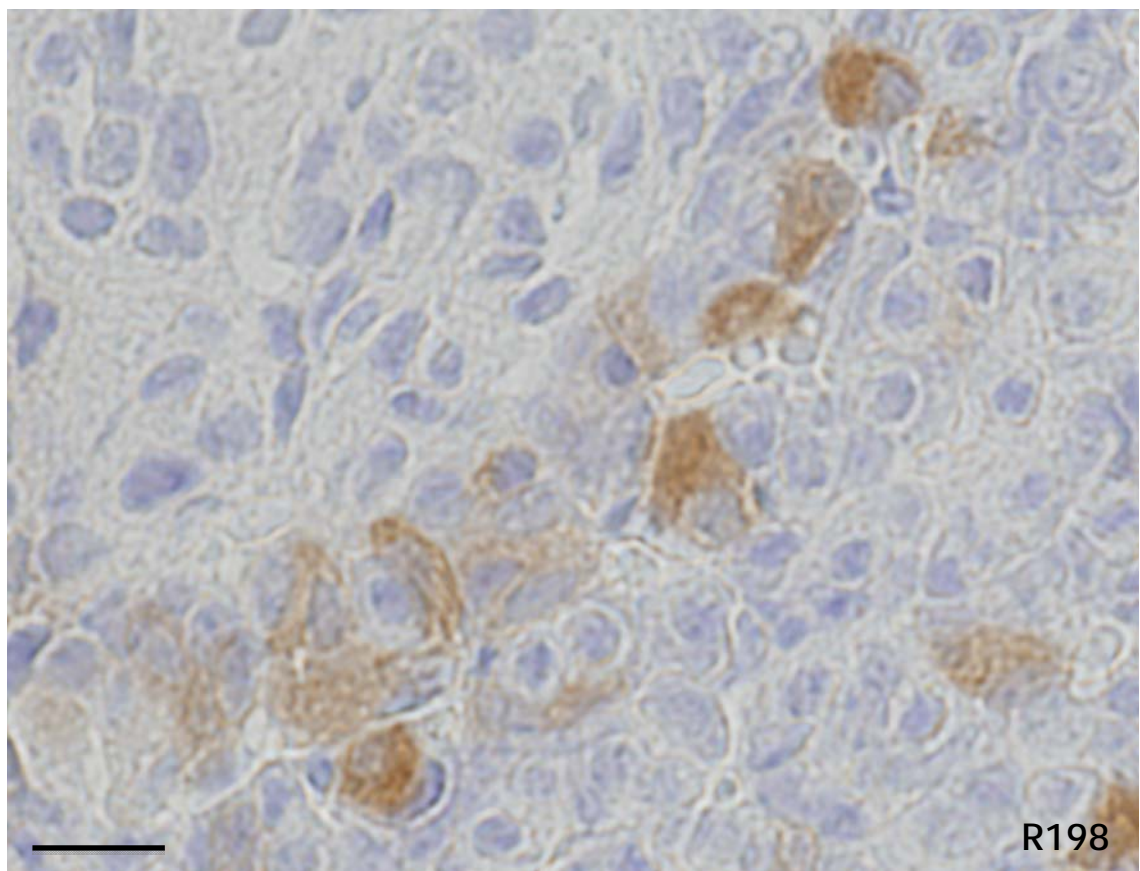
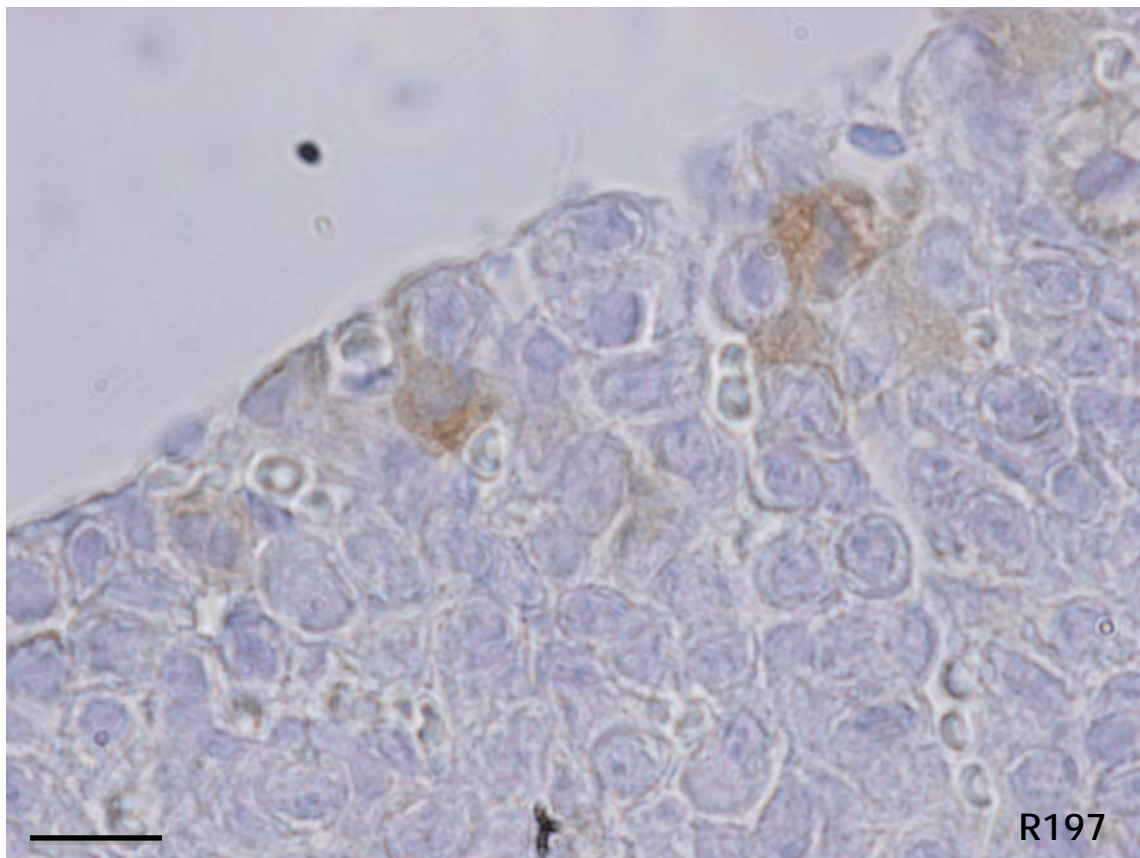
En los machos wild type estas células eran poligonales, con núcleos redondeados y muchas veces excéntricos.



Su aspecto adoptaba aspecto granular fino o bien presentaba una reacción compacta poco intensa.

Figura R197: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25

Figura R198: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25



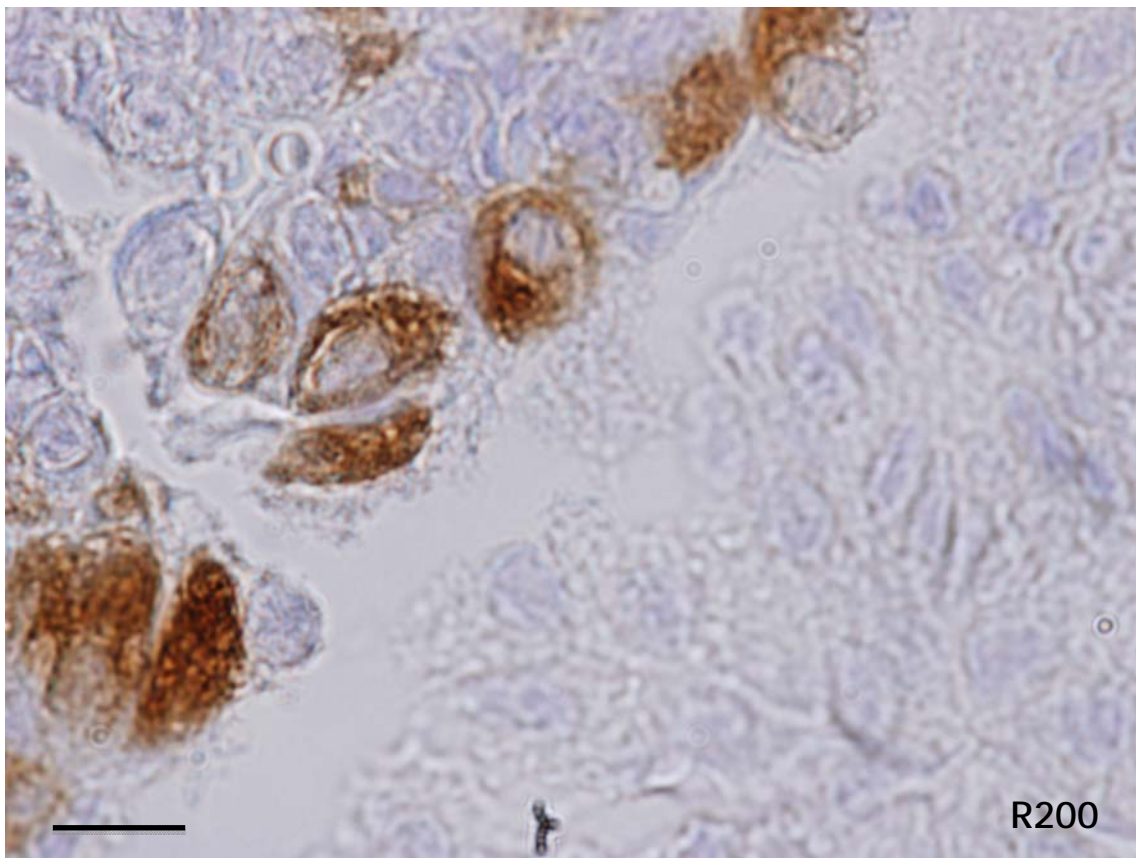
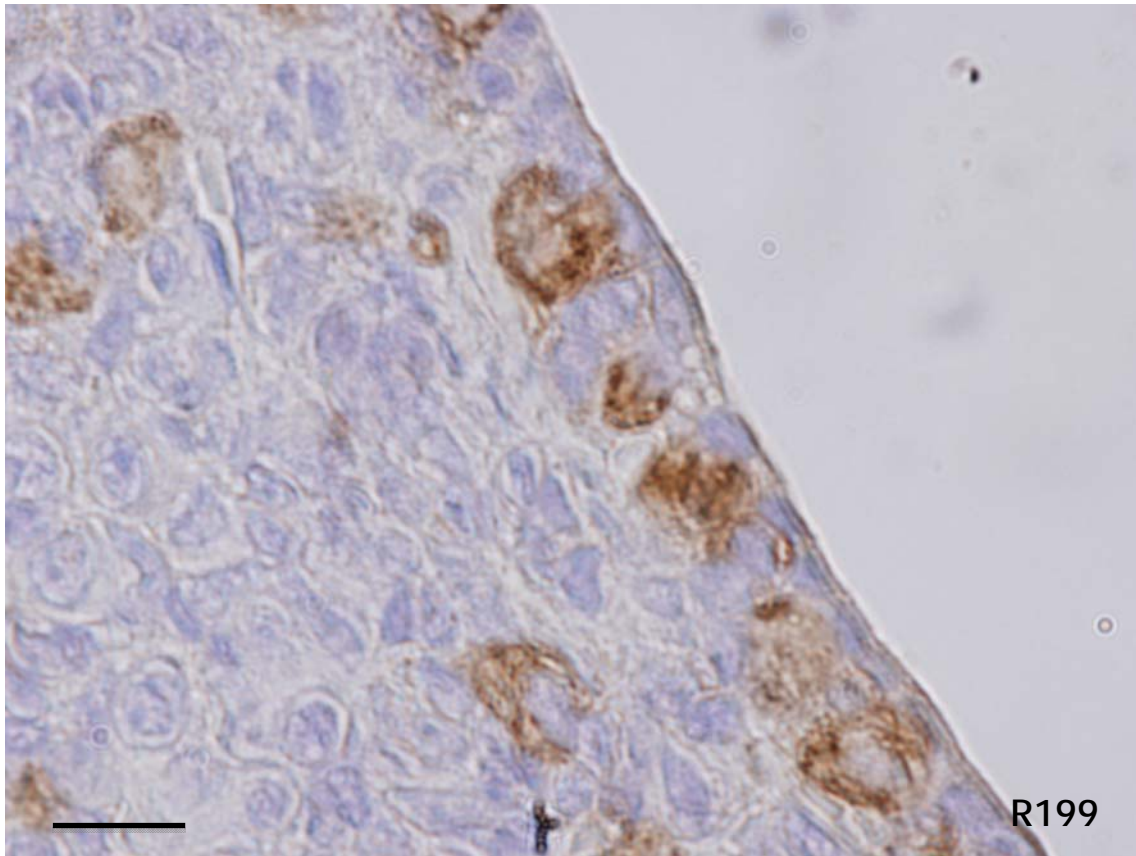
Las células positivas a LH de esta región en los machos knock out fueron principalmente ovaladas o redondeadas (figuras R199 y R200).

Su citoplasma presenta un aspecto granular grueso, con imágenes negativas del aparato de Golgi y a veces espacios vacíos que podrían ser cisterna de retículo endoplásmico rugoso.

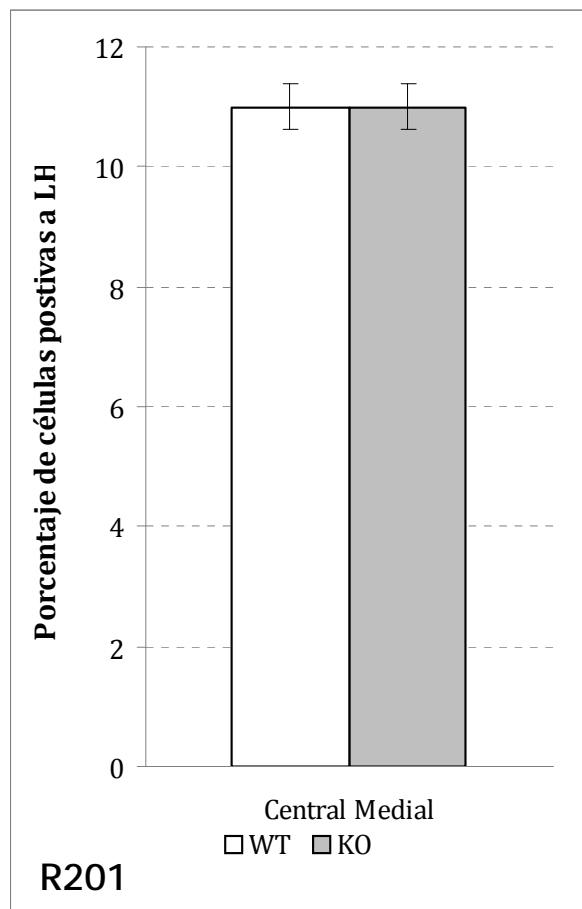
Su núcleos, hipocromáticos, eran ovales o redondeados y casi siempre excéntricos.

Figura R199: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25

Figura R200: Micrografía de la región medial próxima a la pars intermedia mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25



Región Central Medial. (8m)



Las diferencias observadas entre machos wild type y machos knock out en las células positivas a LH de la región central medial afectan a las características de las células, pero no a su número.

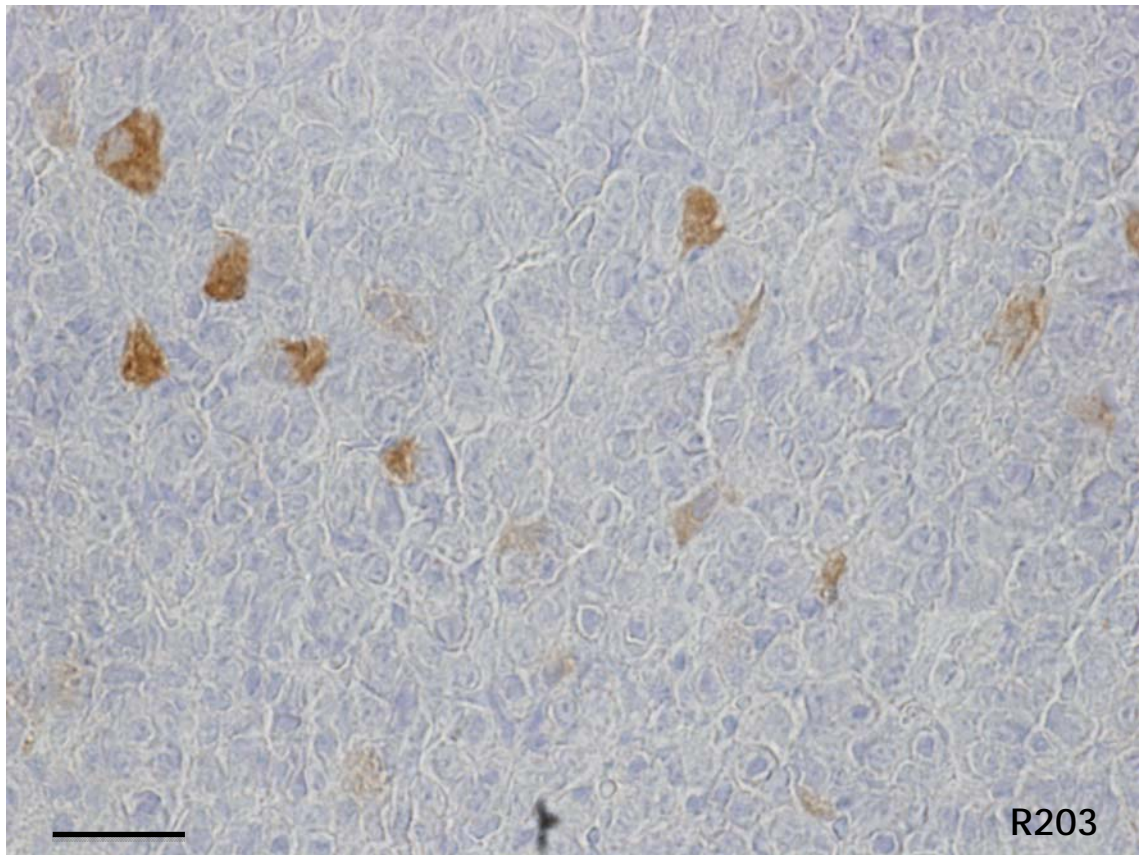
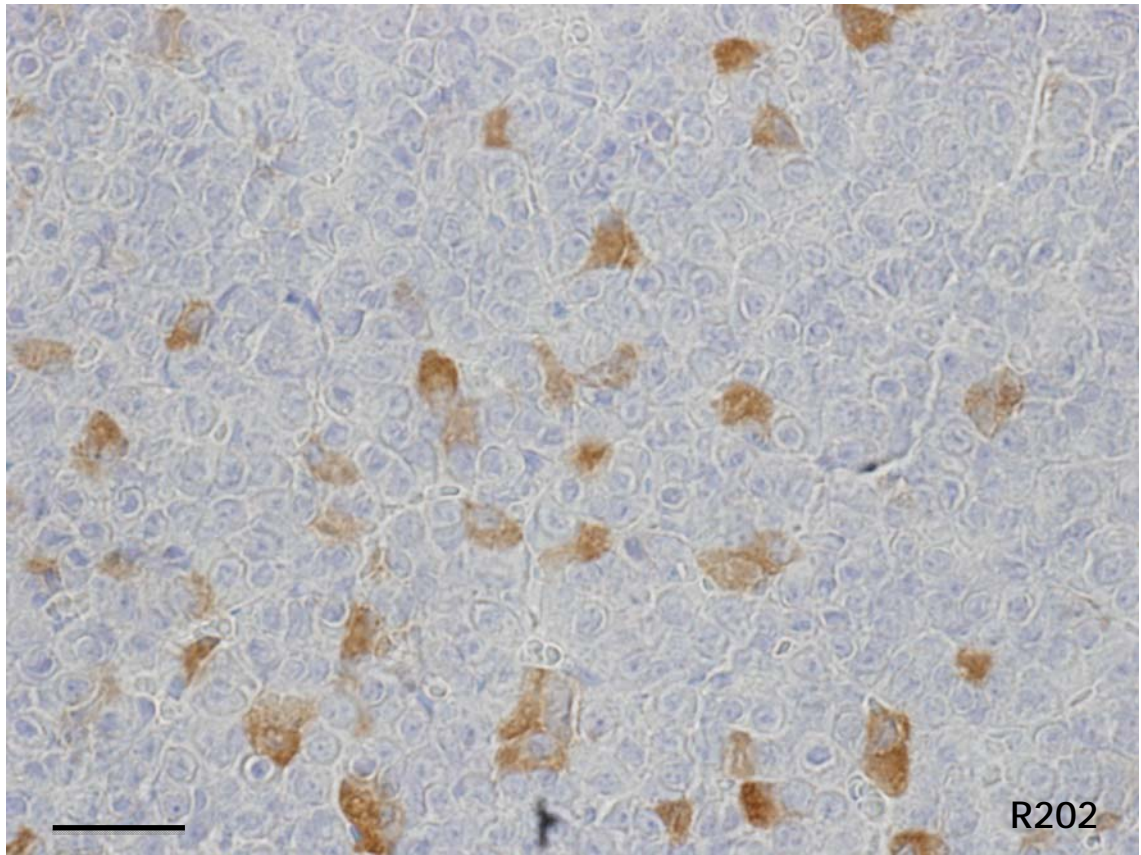
Como muestra la gráfica de la figura R201 el porcentaje de células positivas fue casi idéntico en esta región.

En los machos wild type, las células se disponían dispersas y aisladas por toda la región. En ocasiones formaban pequeños grupos de 2 ó 3 células (figuras R202 y R203).

No obstante, grandes porciones de esta región estaban desprovistas de células positivas a LH (figura R203).

Figura R202: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50

Figura R203: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50



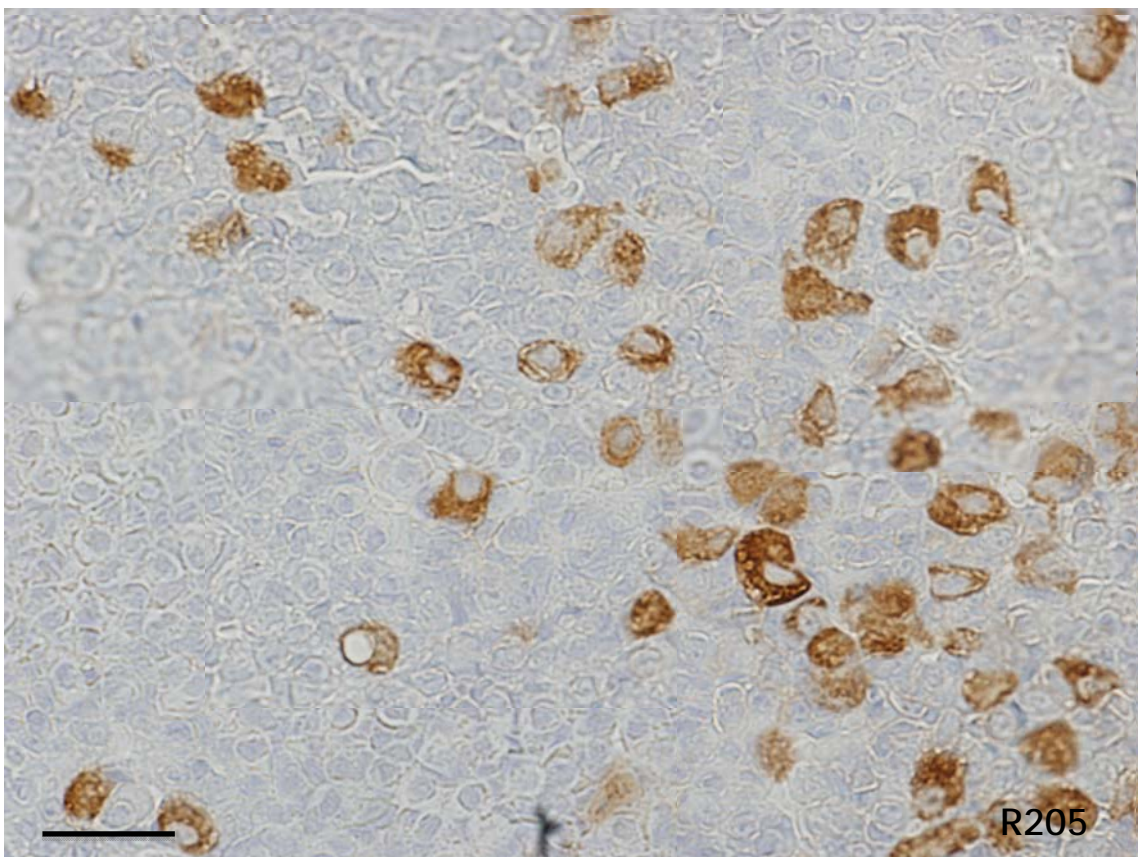
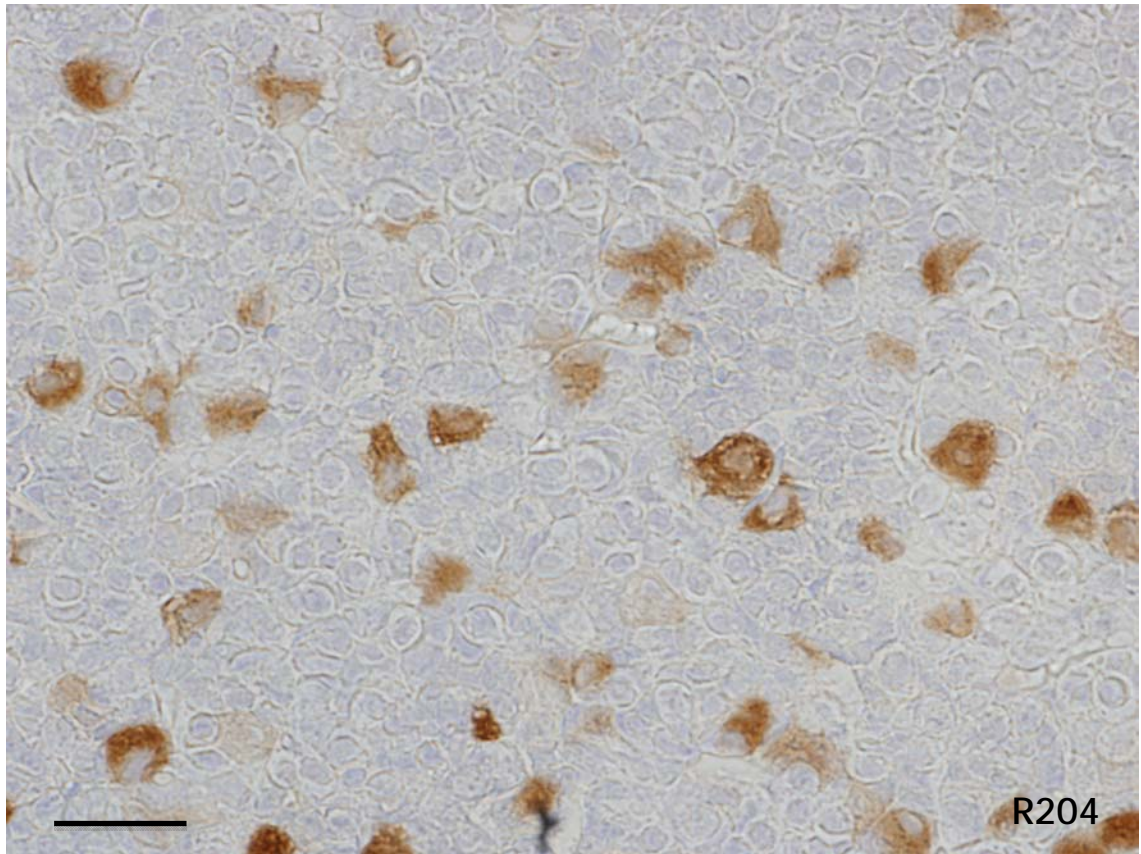
Las células positivas a LH de esta región en los machos knock out presentaron una intensidad de reacción más fuerte que las de los machos wild type (figuras R204 y R205).

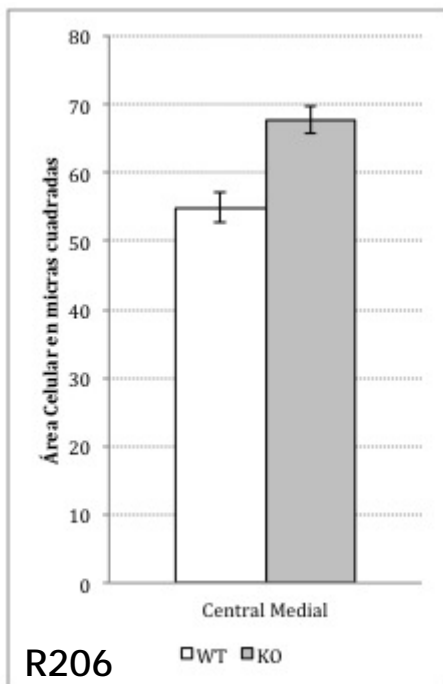
Si bien estas células se distribuyeron de una forma muy parecida a la descrita para los machos wild type, asiladas y dispersas por la región (figura R204) y también aparecieron dejando amplias zonas sin células reactivas (figura R205), como puede apreciarse en la figura R205 al lado de zonas sin células positivas a LH había otras en la que estas células abundaban.

Cuando las células positivas se agrupan en un área de la región central medial, lo hacían formando claustros ligeramente abiertos que rodeaban a células no reactivas.

Figura R204: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

Figura R205: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50





En esta región, las células positivas a LH de los machos knock out fueron de mayor tamaño ($p < 0.05$) que las de los machos wild type (figura R206).

El tamaño de los núcleos en los machos knock out también fue mayor ($p < 0.01$) que el observado en los wild type (figura R207).

A altos aumentos de microscopio, se observó como las células positivas a LH de esta región, en los machos wild type eran células con una intensidad de reacción débil (figuras R208 y R209).

Aunque su forma fue variable, predominaron las células ovaladas de núcleo generalmente excéntrico.

Los citoplasmas presentaban aspecto granular fino. En alguna ocasión se evidenció la presencia de dilataciones vesiculares que se corresponden con las cisternas del retículo endoplásmico rugoso.

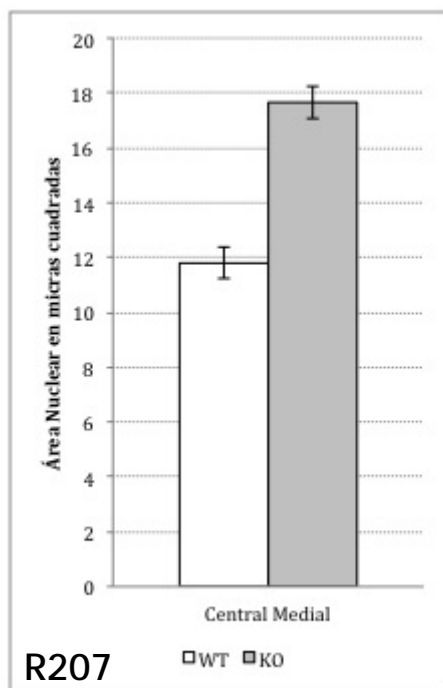
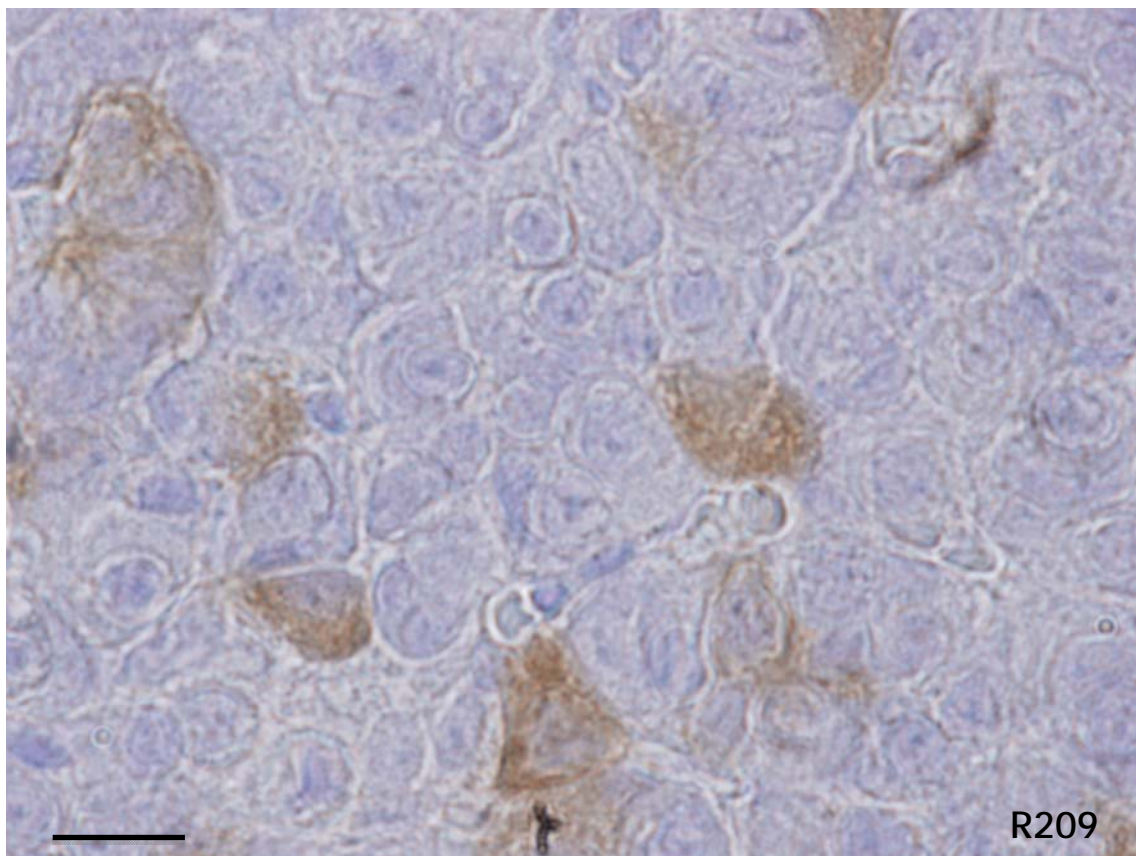
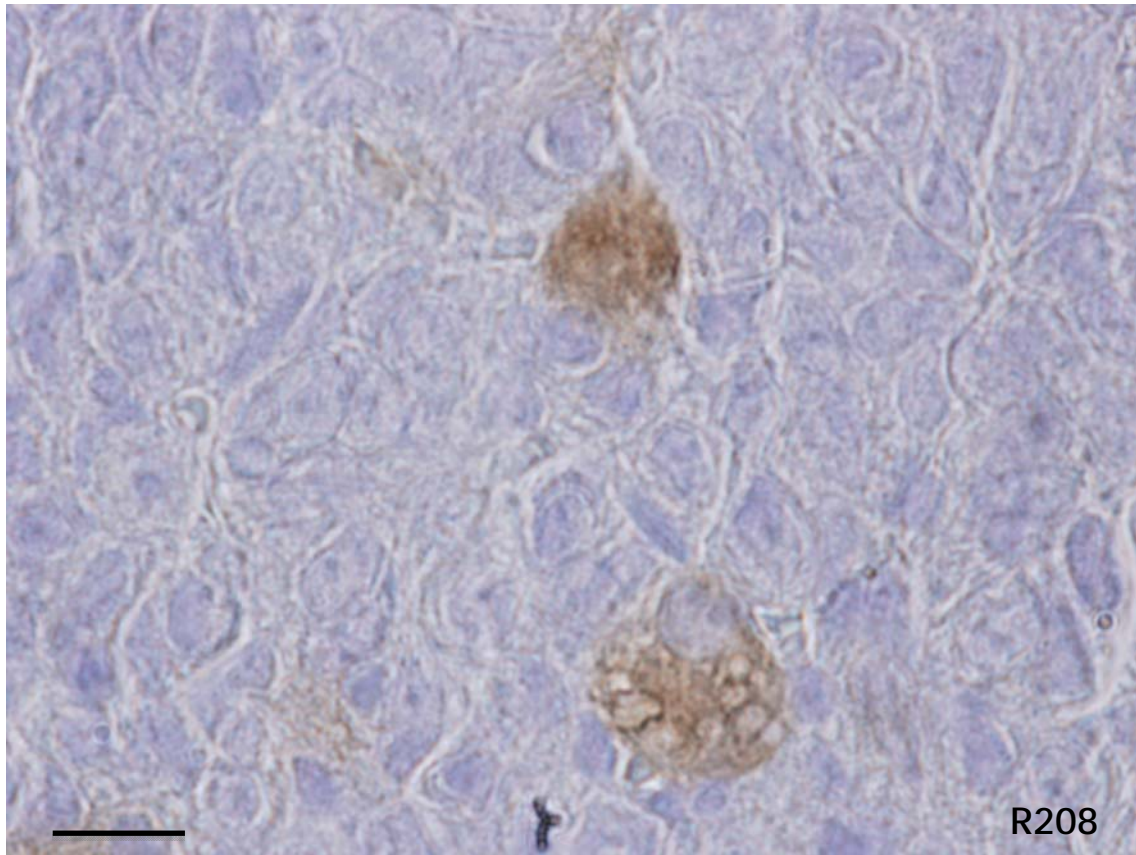


Figura R208: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25

Figura R209: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25



Las figuras R210 y R211 muestran a altos aumentos de microscopio las características morfológicas que presentaron las células positivas a LH de esta región en los machos knock out, claramente distintas de las de los machos wild type.

Junto a células ovaladas (figura R210) aparecieron células poligonales o células en copa (figura R211).

Los núcleos redondeados y grandes casi siempre eran excéntricos.

Los citoplasma aparecían intensamente teñidos aunque la reacción, granular gruesa, rara vez fue homogénea.

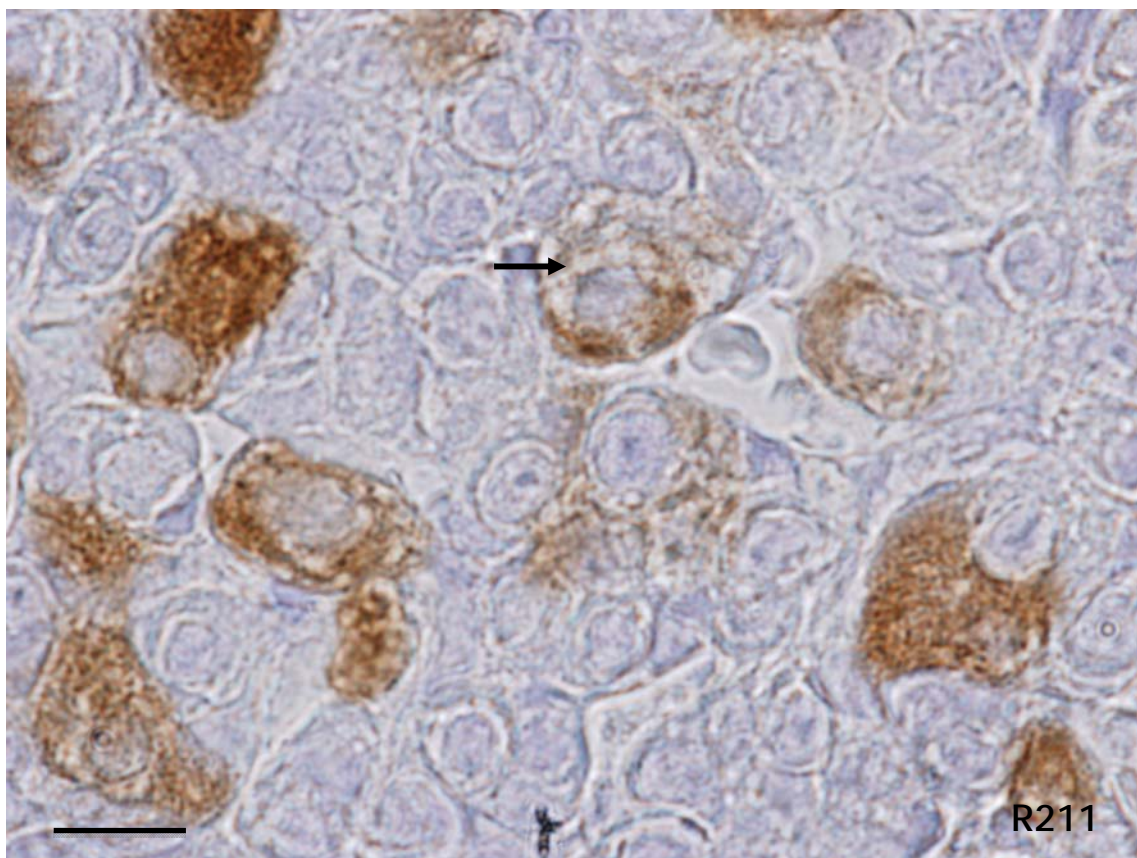
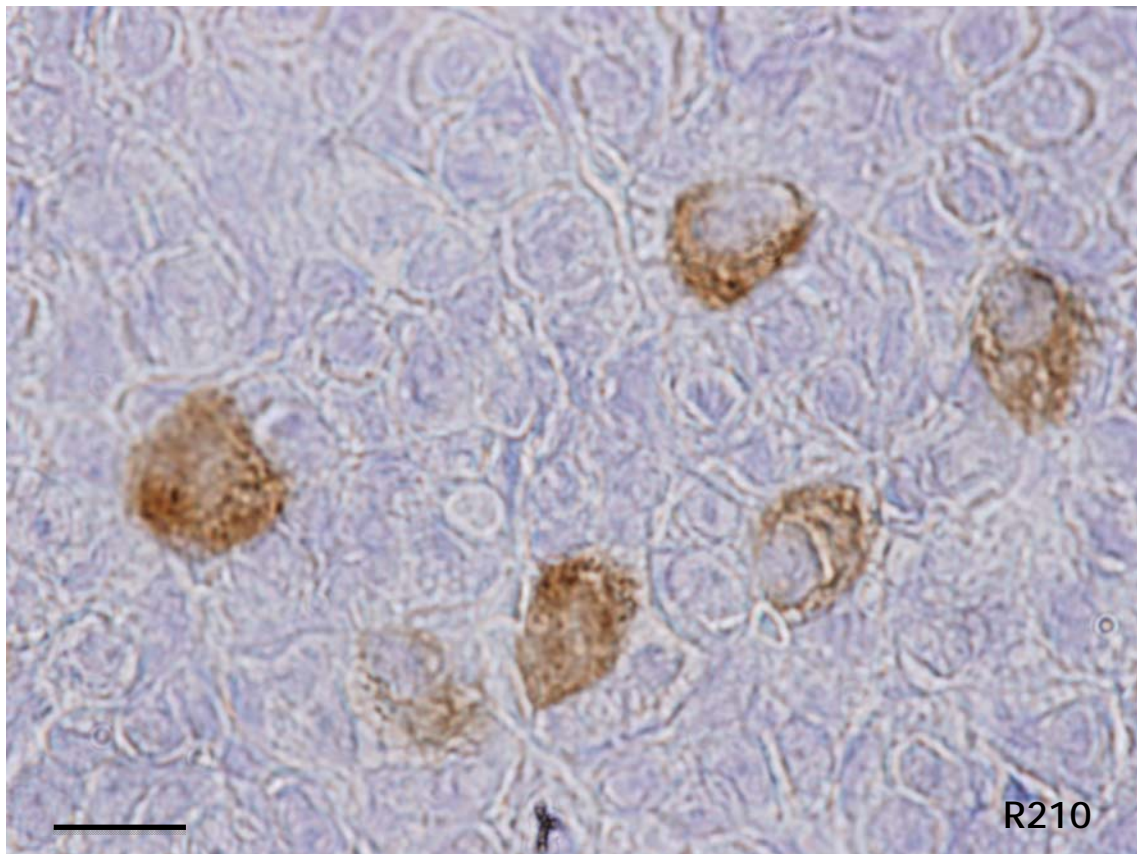
Fue muy frecuente encontrar la imagen negativa del aparato de Golgi, generalmente dispuesta en torno al núcleo de la célula.

También fue frecuente observar dilataciones vacuolares correspondientes a cisternas de retículo endoplásmico rugoso, aunque en estos animales estaban perfiladas por una intensa reacción.

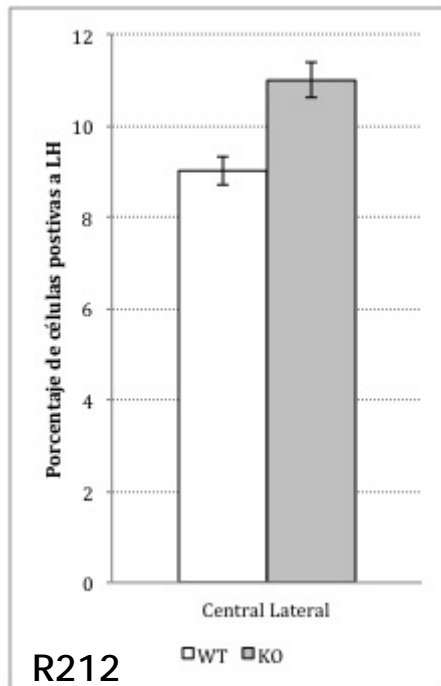
En ocasiones se observaban células en las que estas vacuolas estaban confluyendo para dar lugar luego a una gran vacuola. La flecha en la figura R211 marca una de estas células.

Figura R210: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25

Figura R211: Micrografía de la región central medial mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25



Región Central Lateral (8I).

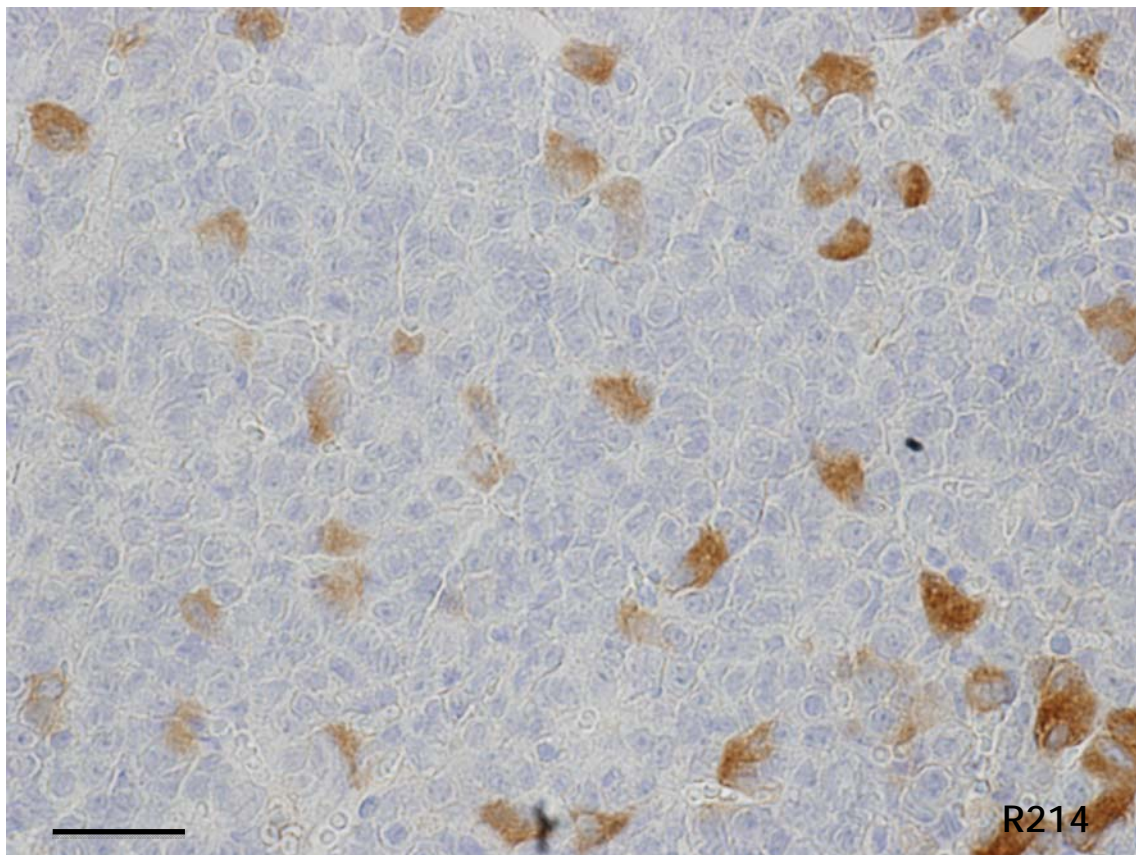
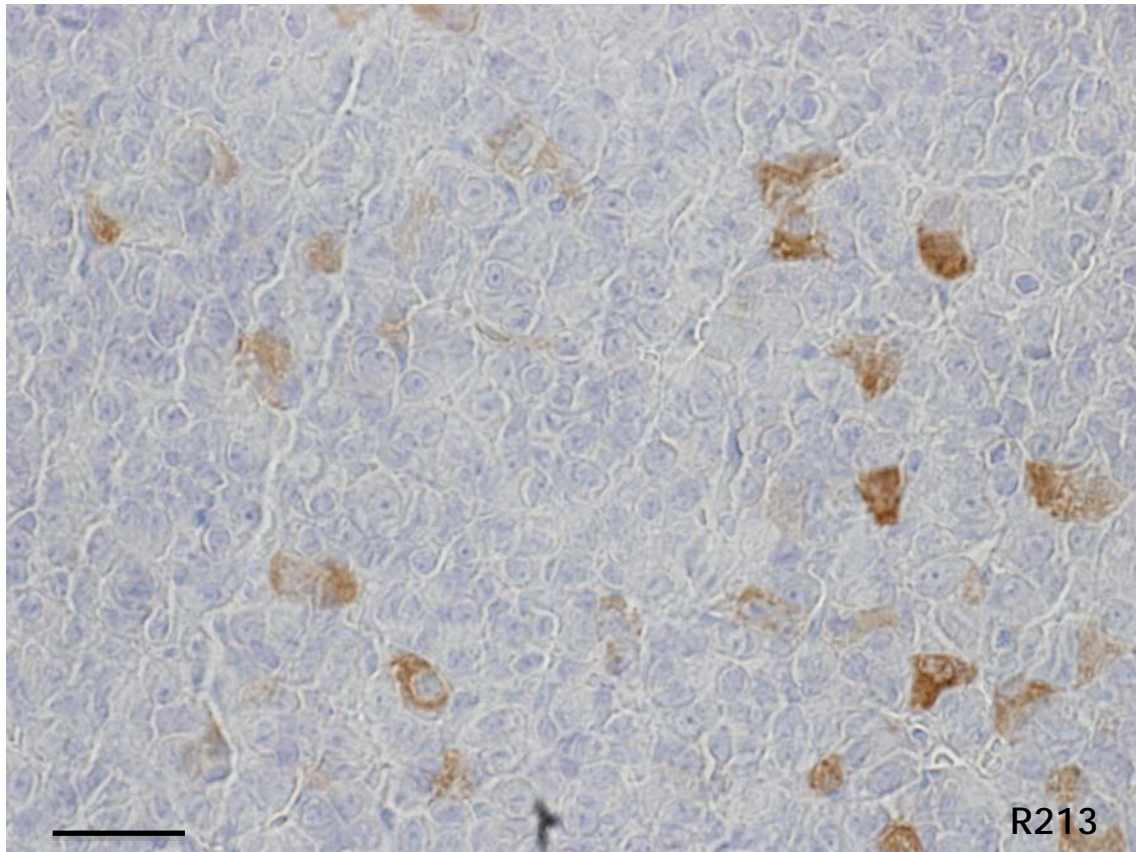


El porcentaje de células positivas a LH en la región central lateral de los machos knock out fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la observada en los wild type (figura R212).

En los machos wild type las células presentaron una intensidad de reacción media y se distribuían aisladas y dispersas por toda la región (figuras R213 y R214).

Figura R213: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50

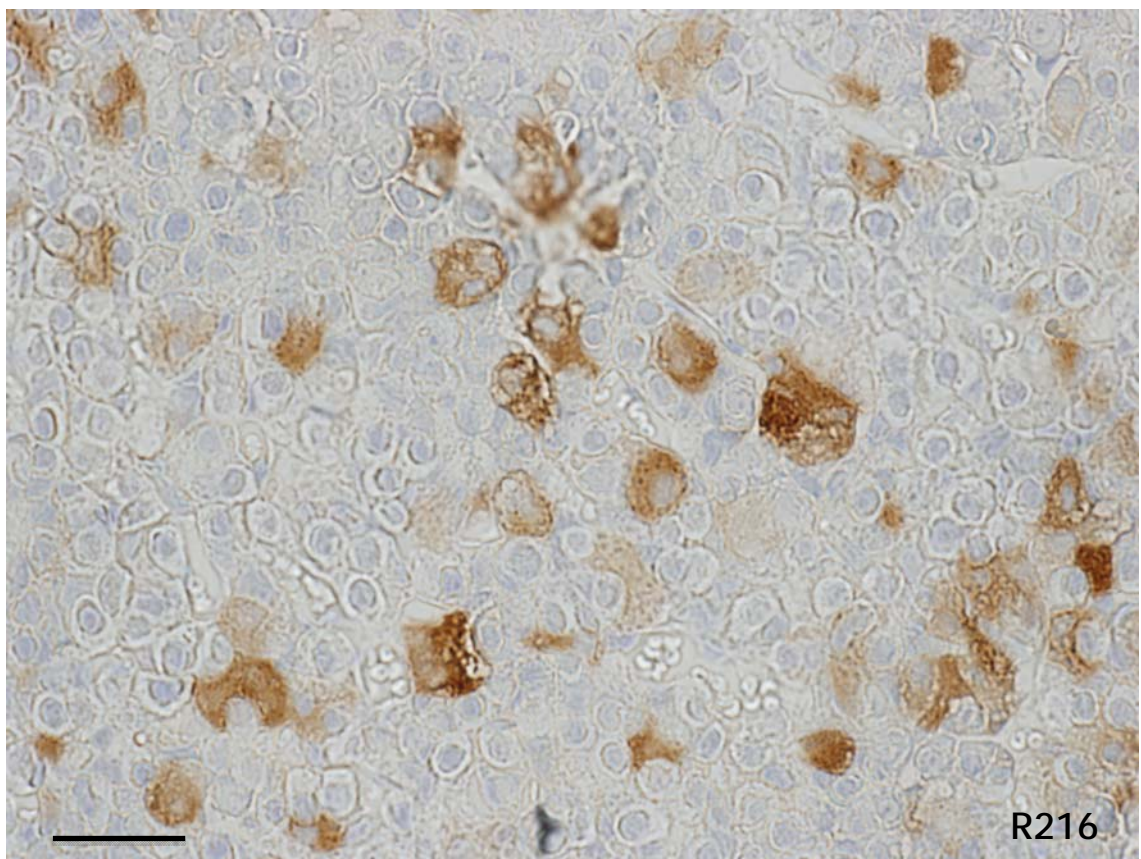
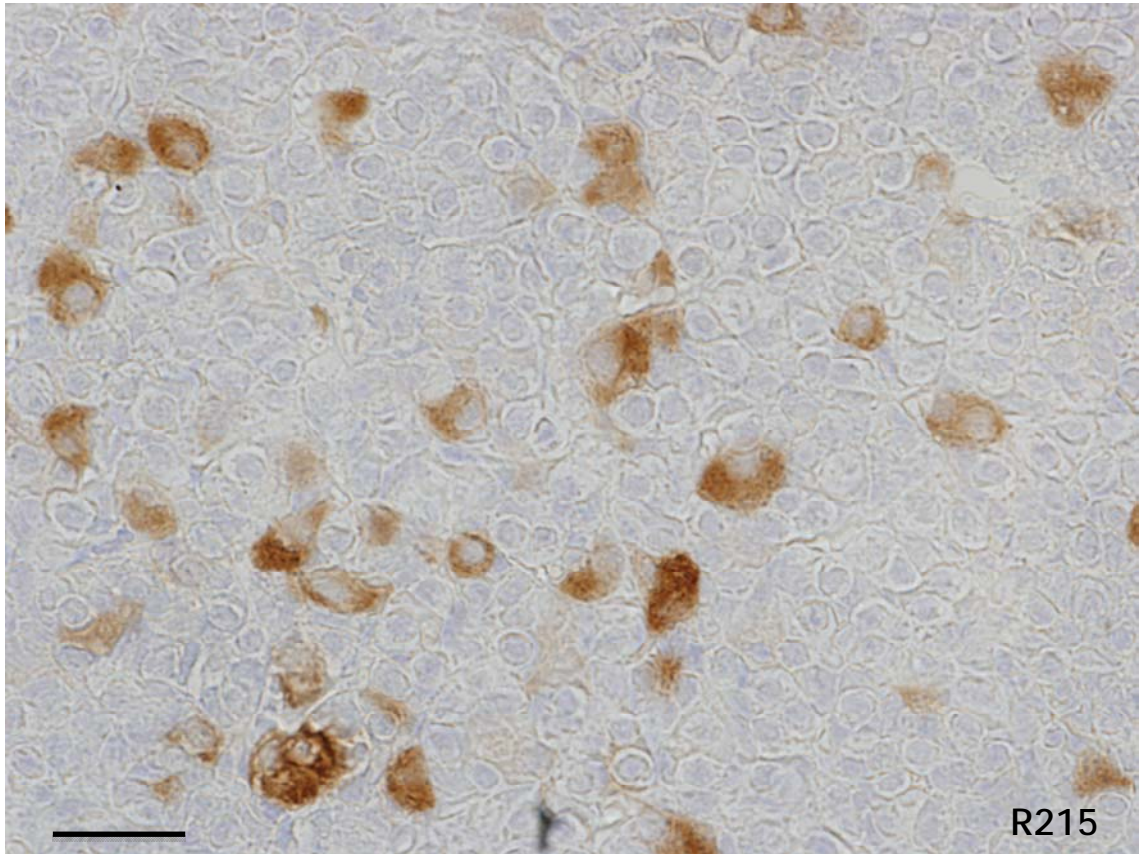
Figura R214: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50

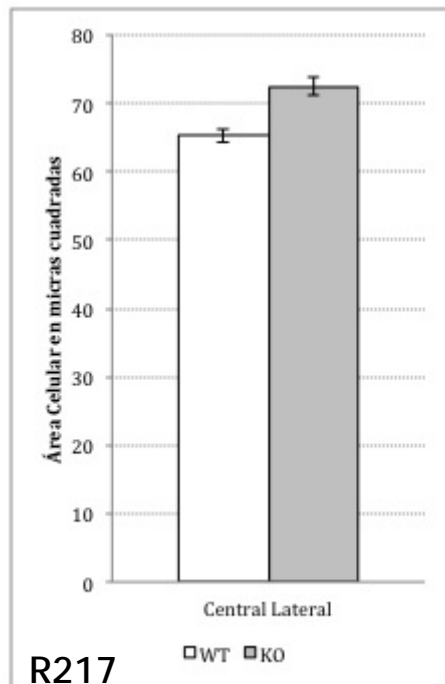


En los machos knock out las células también se dispersaban por toda la región, pero presentaban mayor intensidad de reacción que en los wild type y era frecuente observar claustrros abiertos englobando células no reactivas (figura R215) o en torno a un vaso sanguíneo (figura R216).

Figura R215: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

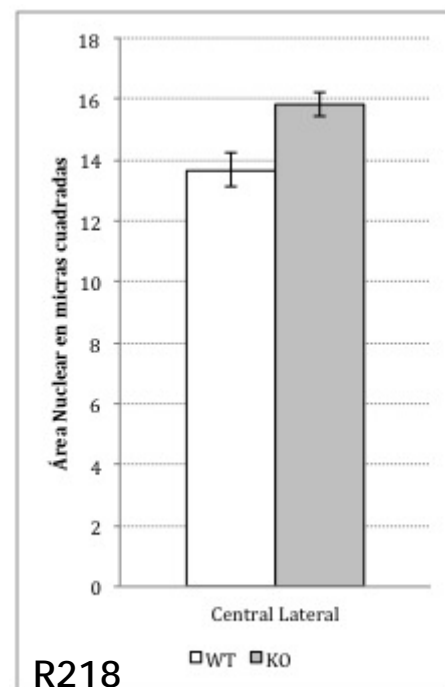
Figura R216: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50





R217

Aunque la diferencia observada en el área celular no fue excesivamente llamativa, dada la gran homogeneidad en el tamaño de las células positivas a LH de los dos grupos de machos estudiados, las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$), siendo mayores las áreas celular y nuclear en los knock out que en los wild type (figuras R217 y R218).



R218

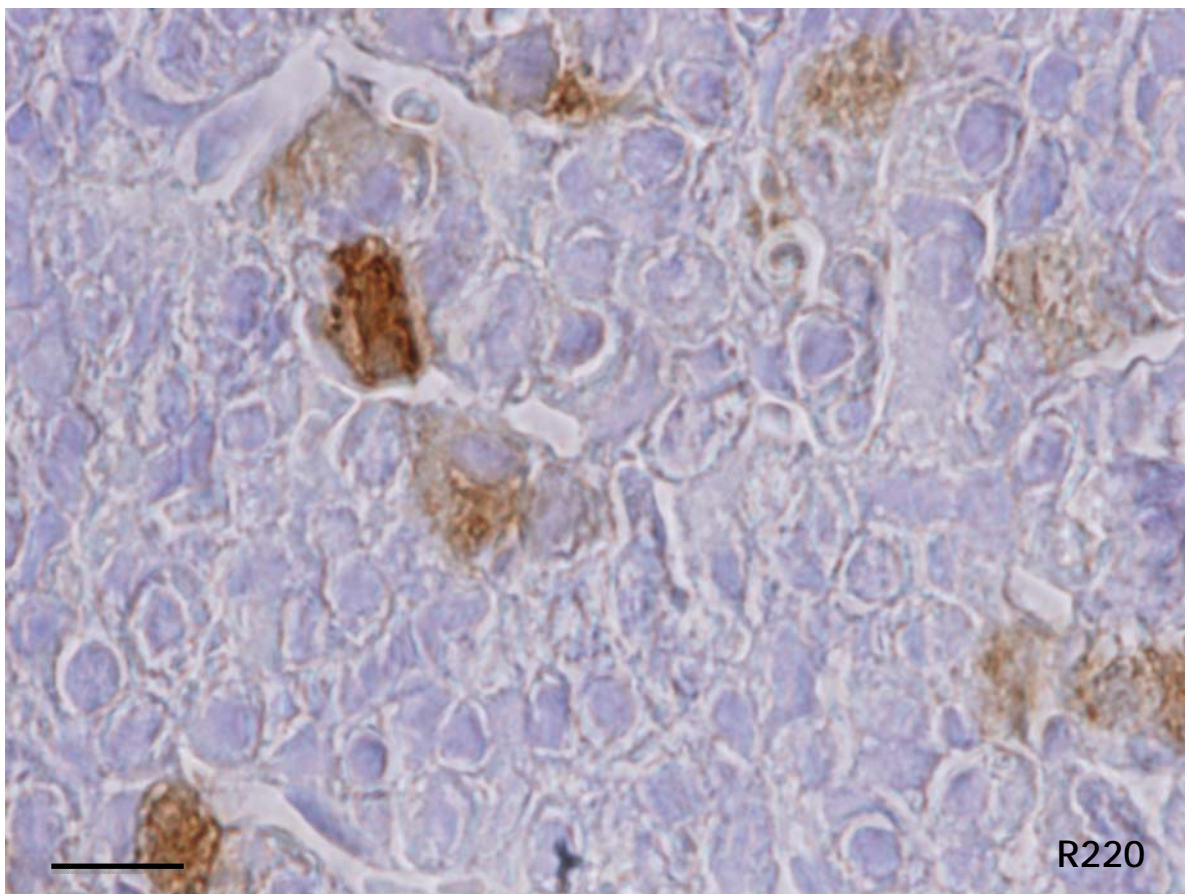
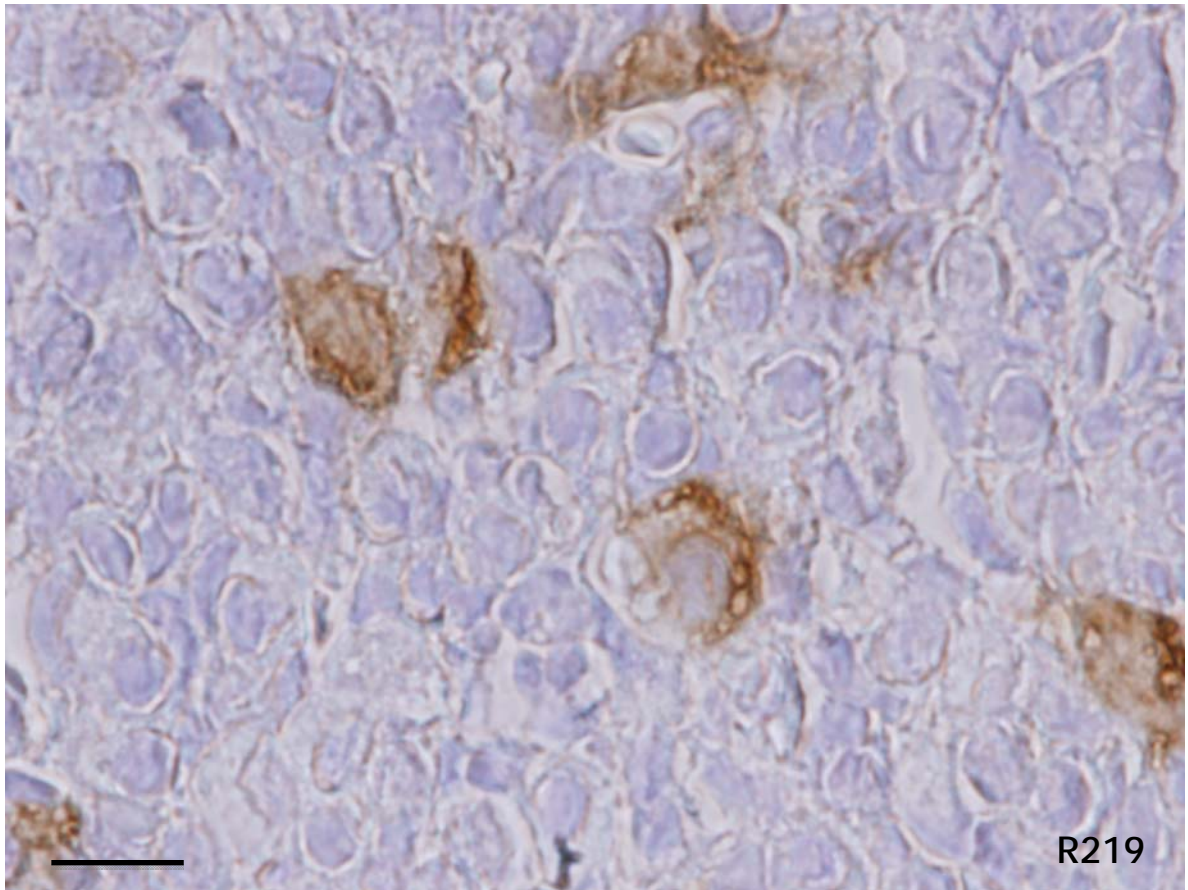
Las células positivas a LH en los machos wild type es esta región presentaron características diferentes a las observadas en el resto de las regiones (figuras R219 y R220).

A grandes aumentos puede apreciarse, al igual que ocurría por otras regiones hipofisarias, que eran células poligonales o irregulares, con un núcleo claro y excéntrico y su citoplasma aparecía generalmente poco reactivo. Sin embargo lo que las hacía diferentes era que el citoplasma sólo presentaba reacción en pequeñas zonas de manera que gran parte del citoplasma no era reactivo.

También es de destacar la gran cantidad de cisternas de retículo dilatadas, en torno a las que se agrupa la reacción.

Figura R219: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25

Figura R220: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25



En los animales knock out, a diferencia de los wild type, las células aparecían más reactivas, con citoplasmas teñidos de forma uniforme y aspecto granular grueso (figuras R221 y R222).

Su forma fue redondeada o poligonal.

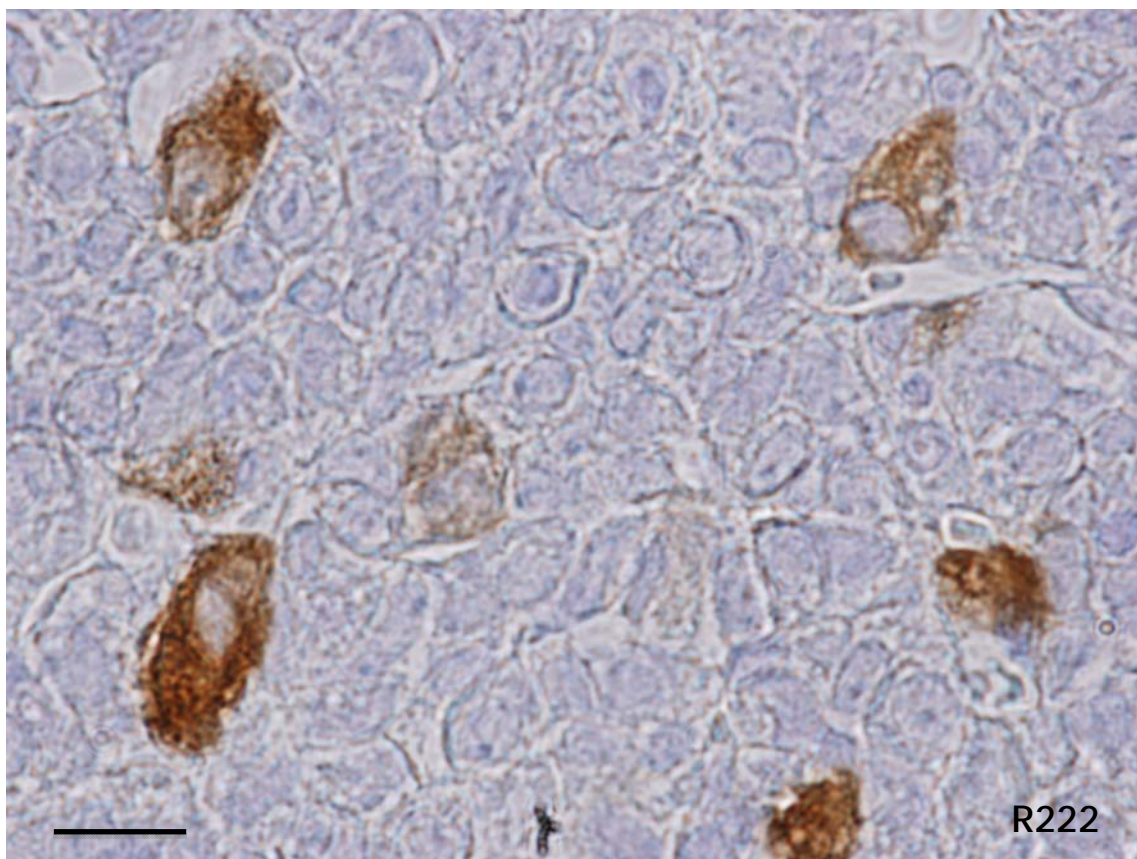
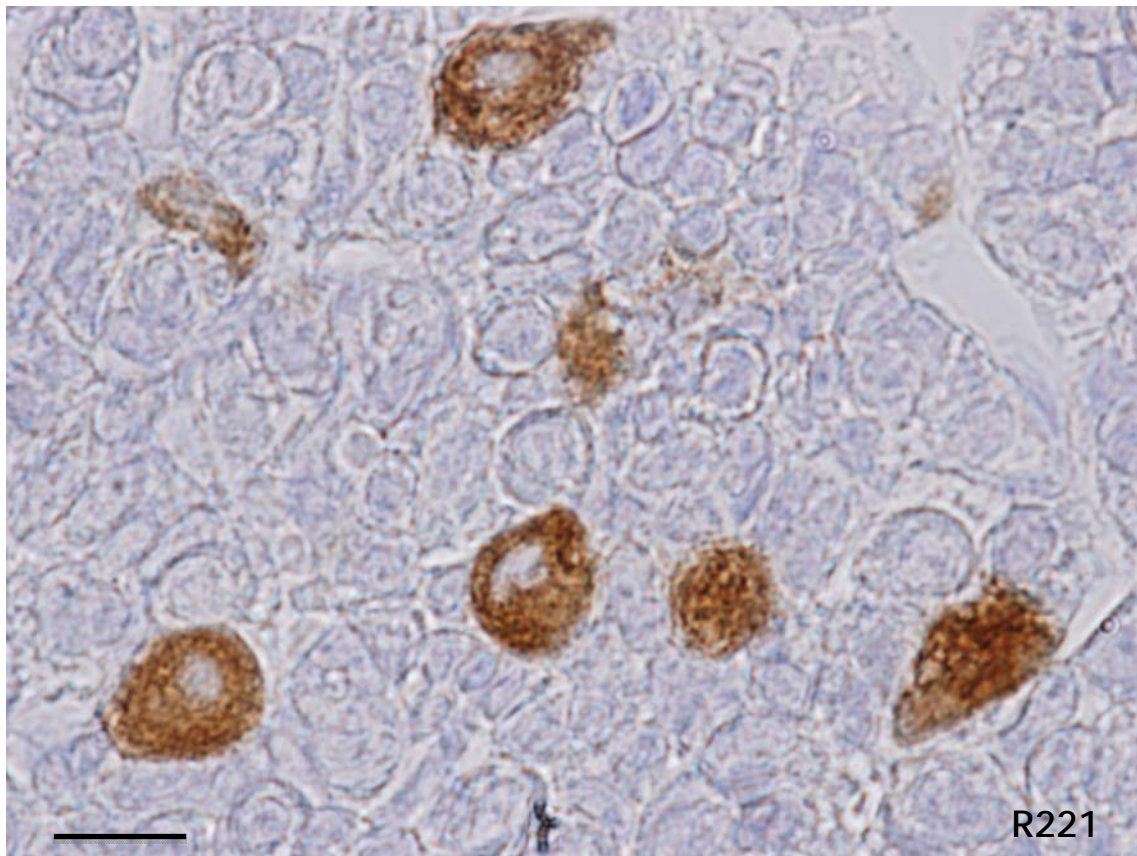
Los núcleos eran ovales y excéntricos a excepción de las células más redondeadas en las que solía ser central.

Algunas células presentaban imagen negativa del aparato de Golgi dispuesto yuxtannuclearmente.

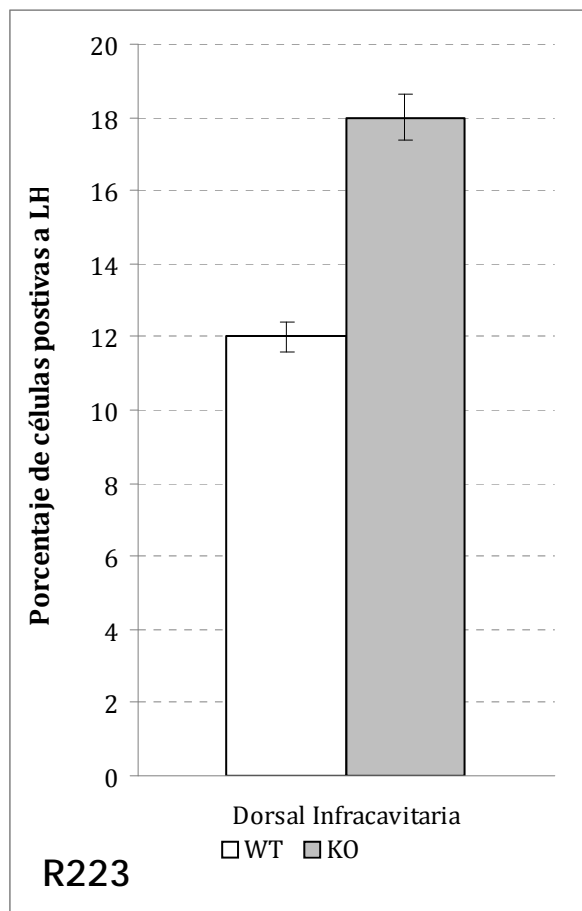
En ocasiones alguna células más pequeñas recordaba en parte a las células que se vieron en los animales wild type (figura R222).

Figura R221: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25

Figura R222: Micrografía de la región central lateral mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25



Región dorsal infracavitaria (7).



En la región dorsal infracavitaria de la hipófisis, las células positivas a LH en los machos knock out, fueron significativamente ($p < 0.01$) más numerosas que en los machos wild type (figura R223).

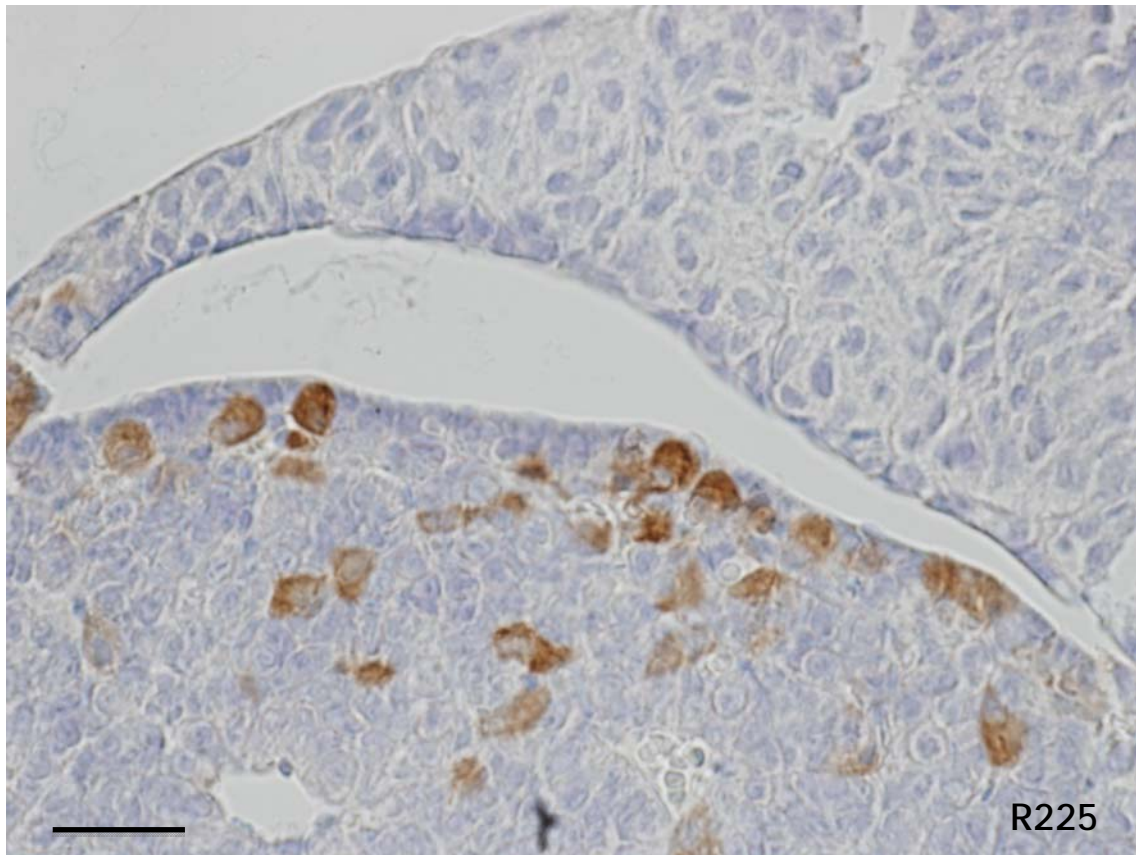
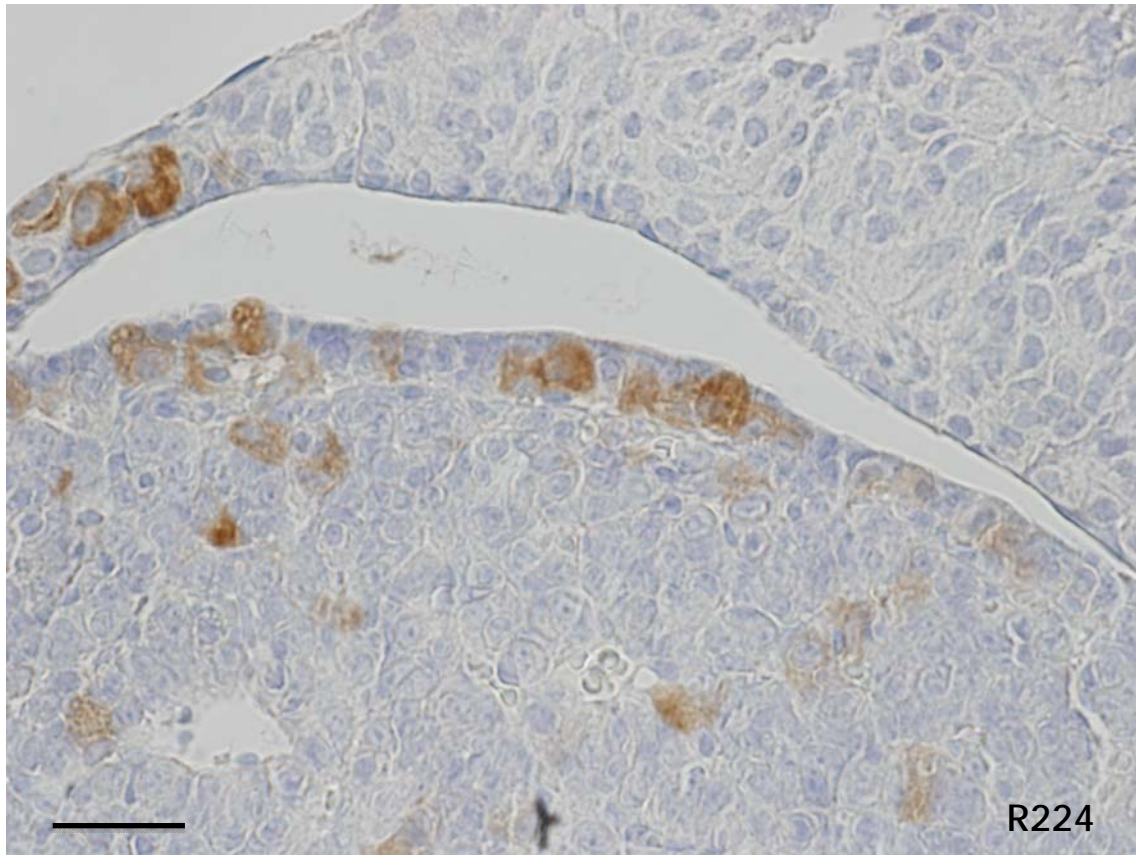
En los machos wild type las células formaban un cordón discontinuo en el estrato limitante, justo por debajo de la caverna hipofisaria (figuras R224 y R225).

En ocasiones, algunas de estas células hacían protrusión hacia la luz de la caverna (figura R224)

Subyacente a él, en profundidad dirigiéndose hacia la región central medial, aparecían células dispersas y aisladas (figura R225).

Figura R224: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50

Figura R225: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x50



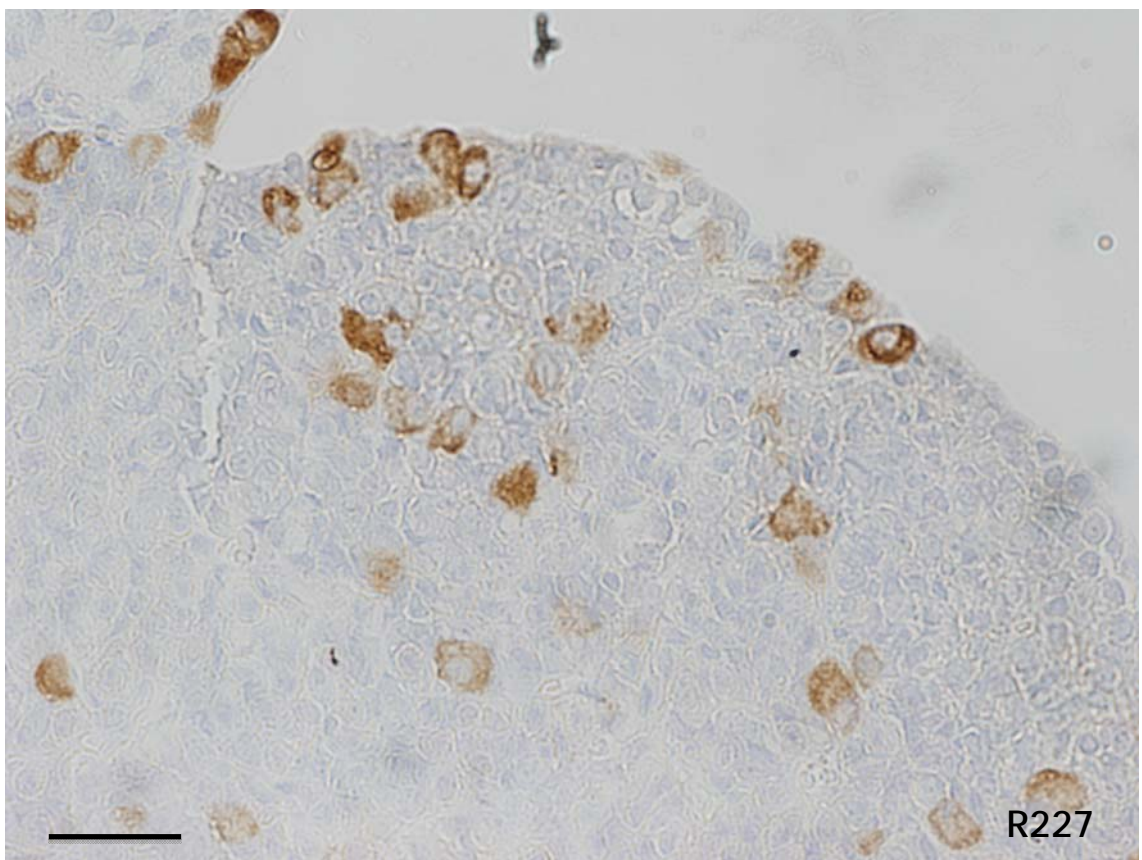
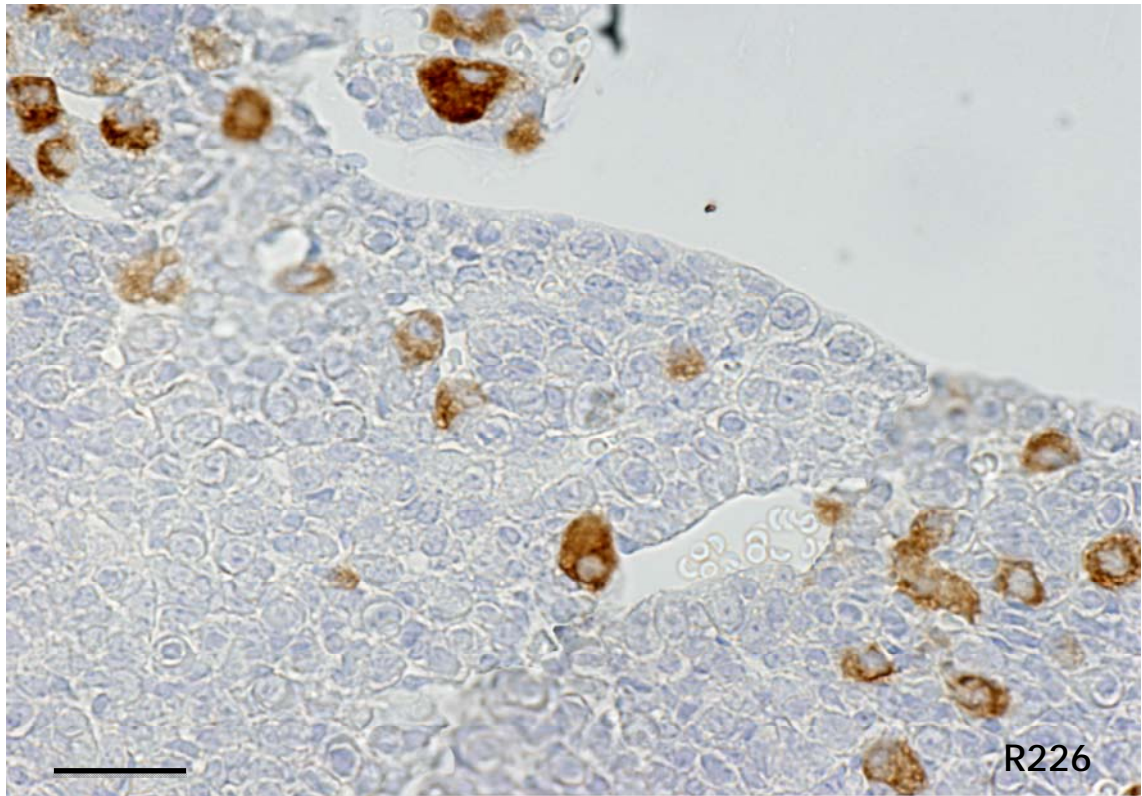
En los machos knock out, las células aparecieron con mayor intensidad de reacción (figuras R226 y R227).

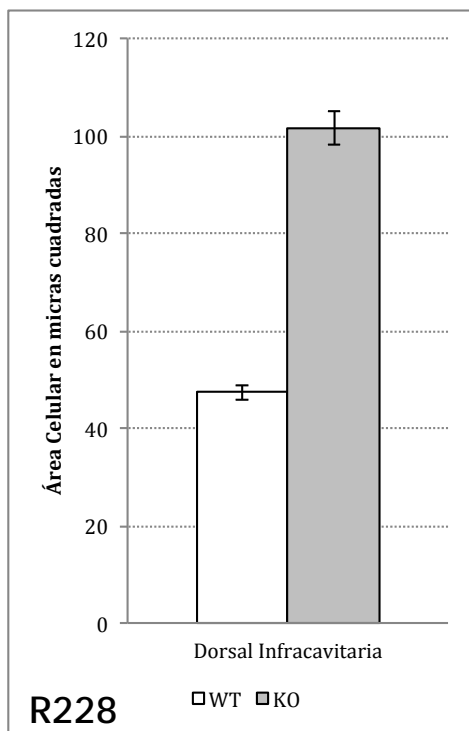
En ocasiones, el cordón adyacente a la caverna hipofisaria no existía y las células subyacentes, dispuestas en la profundidad de la región, eran más numerosas que en los machos wild type y forman grupos de 2 ó 3 células, generalmente en relación con vasos sanguíneos dilatados (figura R226).

Cuando había células próximas a la caverna hipofisaria (figura R227) no formaban un cordón sino que solían agruparse en pequeños islotes dejando amplias zonas sin células reactivas. las células profundas podían formar claustros abiertos que rodeaban a células no reactivas.

Figura R226: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50

Figura R227: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x50





Las gráficas de las figuras R228 y R229 demuestran claramente como el tamaño de las células positivas a LH de la región dorsal infracavitaria de la hipófisis en los machos knock out fue significativamente mayor ($p < 0.005$) que el de los machos wild type.

Esta diferencia de tamaño fue aún más notoria en el tamaño de sus núcleos ($p < 0.001$).

Las células de los machos wild type fueron poco reactivas (figuras R230 y R231).

Su morfología era ovalada, con un núcleo redondeado y generalmente situado en el centro de la célula.

El citoplasma presentaba un aspecto granular fino con alguna imagen cisternal clara.

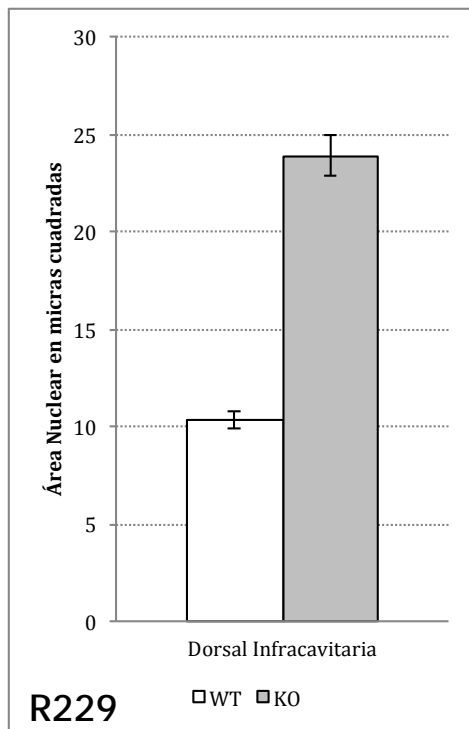
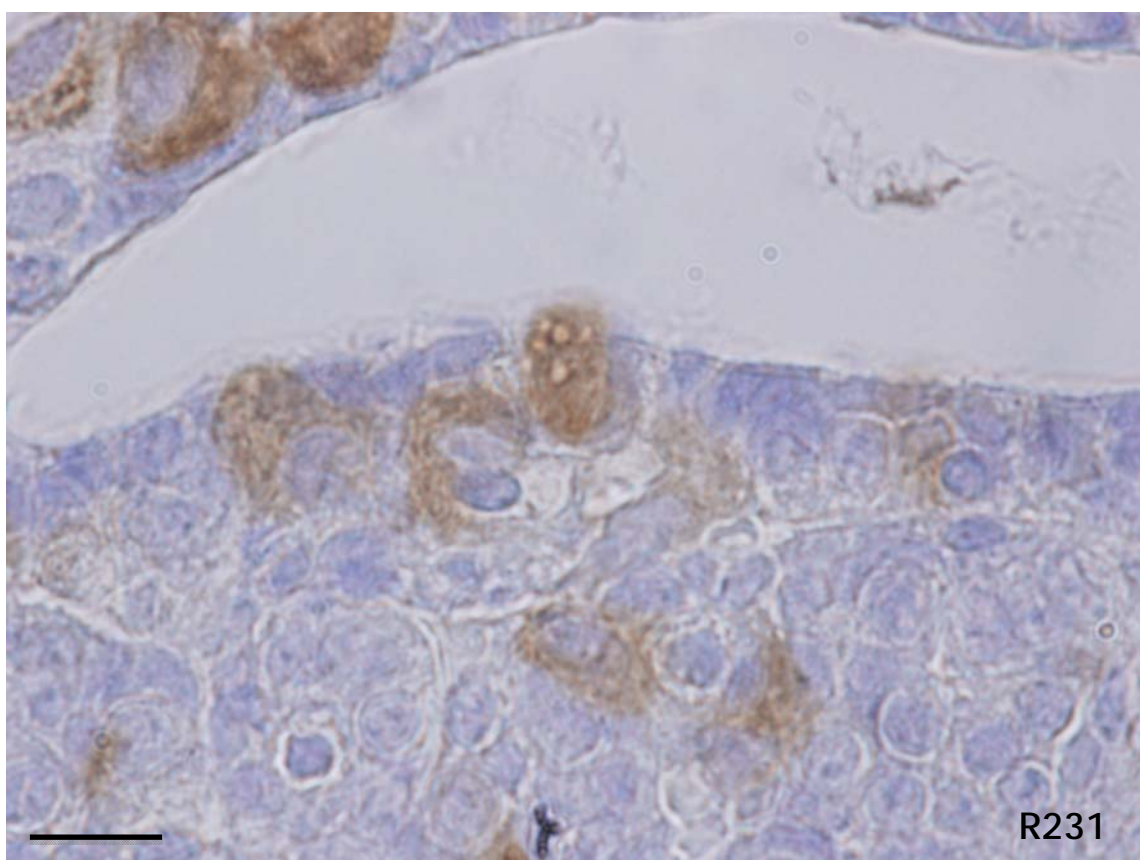
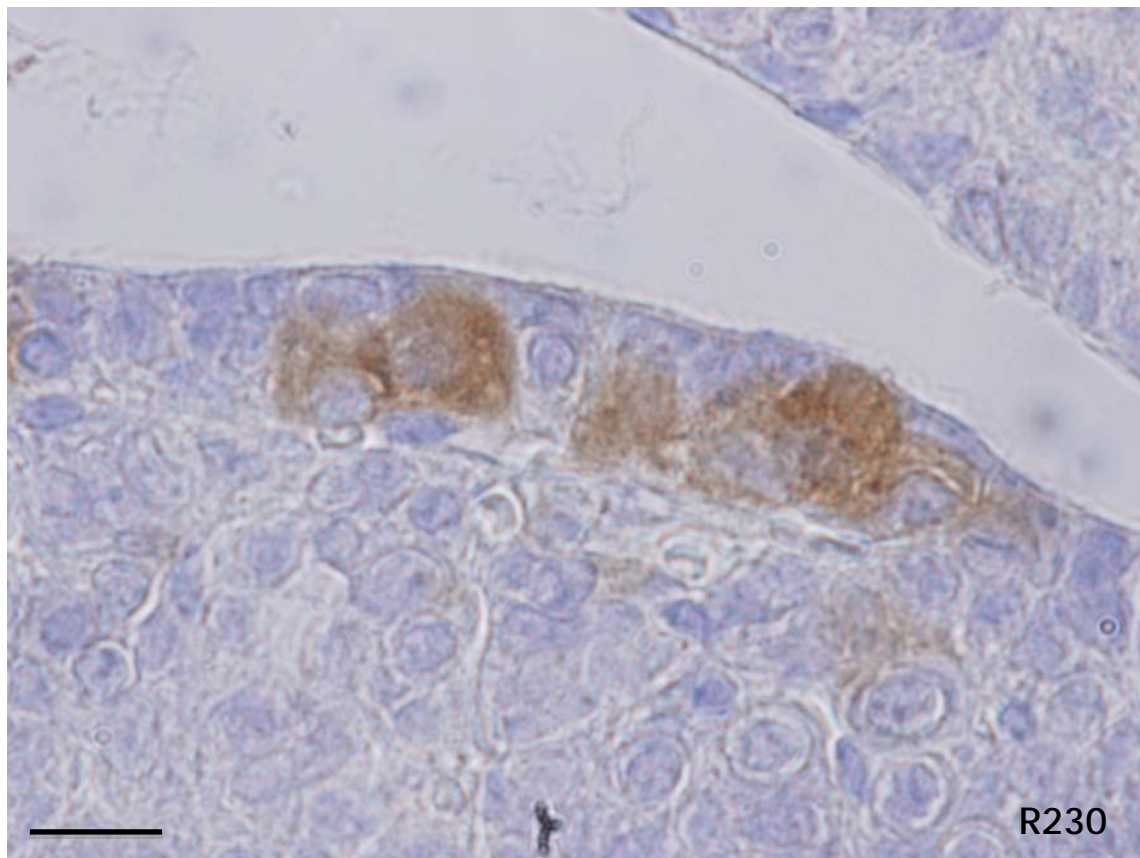


Figura R230: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25

Figura R231: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en un macho wild type. Barra x25



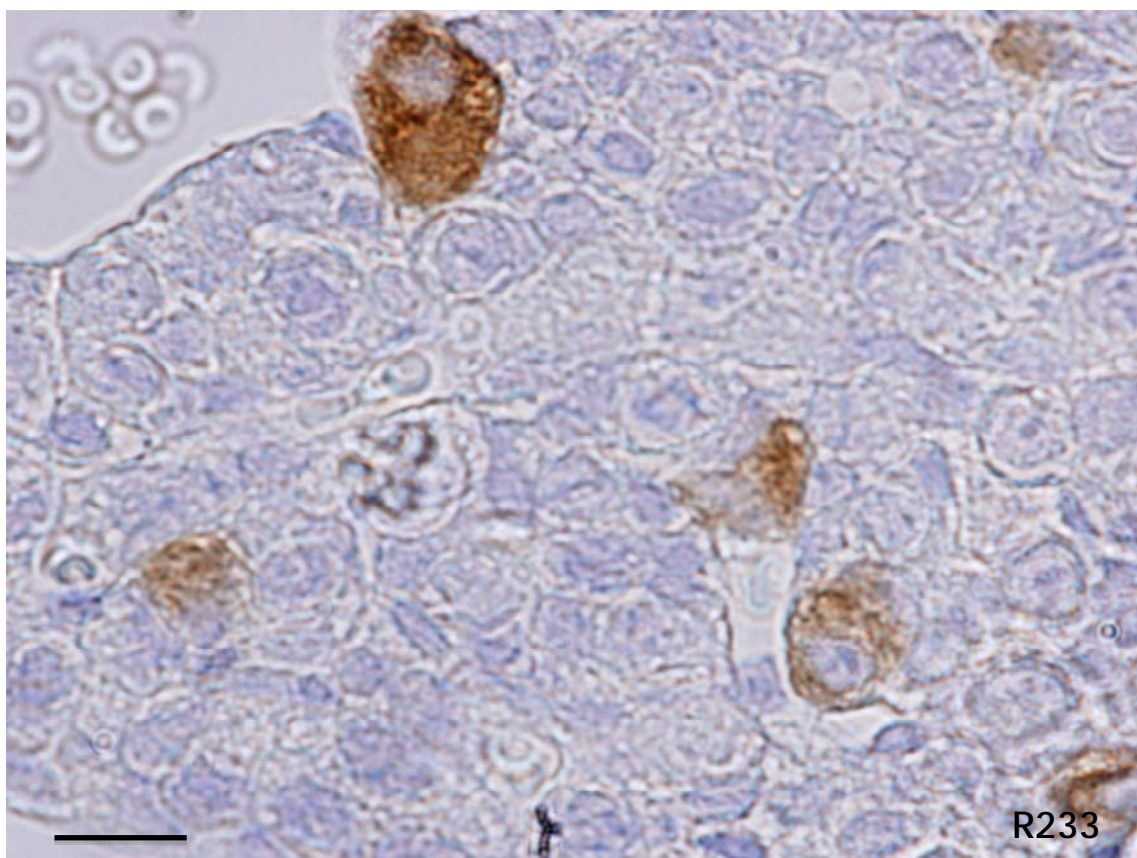
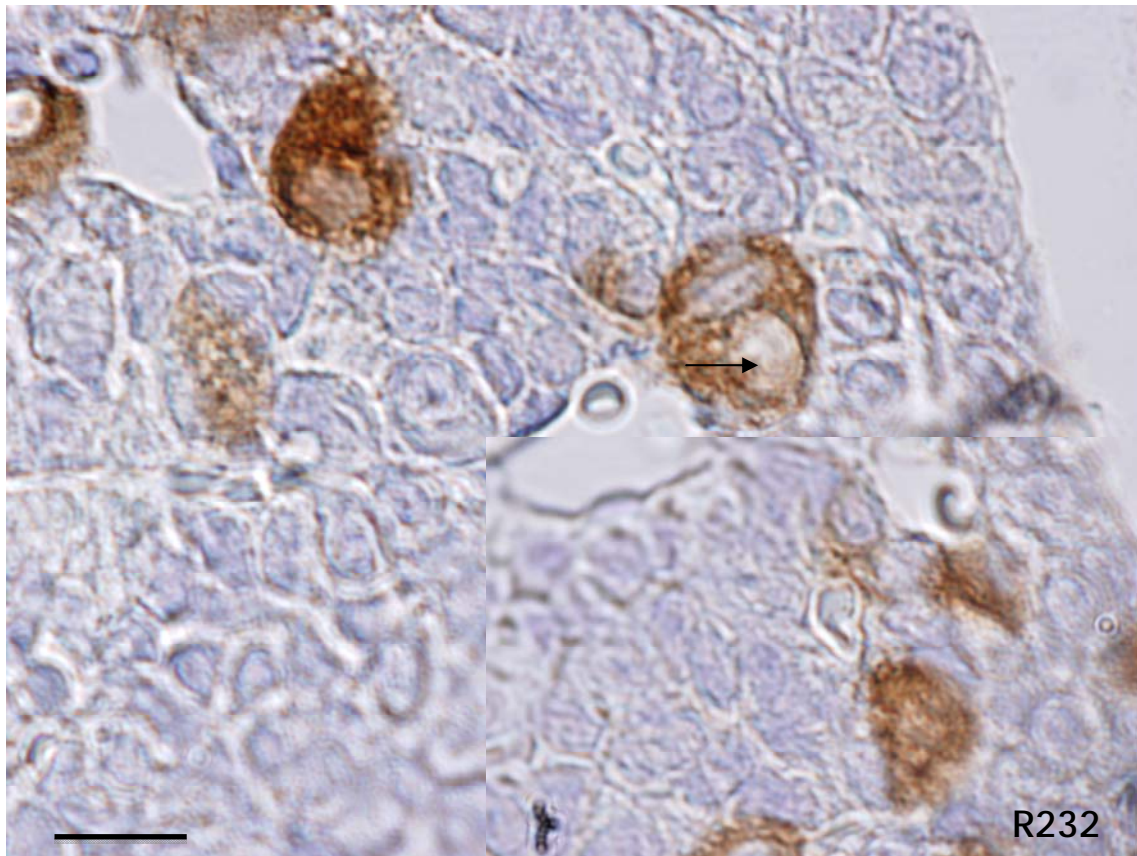
En los machos knock out, las células presentaban una fuerte intensidad de reacción, aunque también aparecían células débilmente reactivas (figuras R232 y R233).

Su forma fue oval o poligonal, con núcleos redondos u ovales y dispuestos excéntricamente.

El citoplasma presentaba aspecto granular grueso, con imágenes cisternales pequeñas pero numerosas y, alguna vez, aunque raras, aparecieron imágenes vacuolares grandes (flecha en figura R232) que les daban el aspecto de células en anillo de sello, típicas de la castración.

Figura R232: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25

Figura R19: Micrografía de la región dorsal infracavitaria mostrando las células positivas a LH en un macho knock out. Barra x25



Discusión

Comentarios sobre la Metodología empleada.

Gran parte de los objetivos de esta Tesis Doctoral estaban dirigidos a comprobar si el la actuación de la aromatasas P450 influía de manera importante sobre las células gonadotropas productoras de LH.

En este estudio hemos utilizado dos tipos de técnicas: inmunocitoquímicas para valorar la especificidad de las células a estudiar, y morfométricas, para comprobar de manera objetiva los cambios habidos en el número de células de LH, en su área celular y en su área nuclear. Trabajando sobre animales knock out para la aromatasas.

Por ello en esta discusión, comentaremos estas técnicas, para pasar a comentar después los resultados obtenidos.

Inmunocitoquímica.

Mediante los métodos de la inmunocitoquímica in vivo o in vitro, se pueden caracterizar las células de la hipófisis anterior que contienen hormonas o péptidos.

Para nuestros estudios hemos utilizado el método de la Estrepto-Avidina Biotina Peroxidasa (Stav-Pox), considerada una técnica sándwich porque necesita de tres complejos de reacción para su realización.

La Stav-Pox es una variante del método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), más moderna y específica. Emplea un primer antisuero (procedente de ratón o conejo) contra el antígeno que se desea estudiar, semejante a la PAP pero normalmente de 5 a 10 veces más diluido; un segundo antisuero (obtenido generalmente de cabra o cerdo) anti-inmunoglobulina (fracción Fc) del primario y que lleva incorporado a su brazo largo varias moléculas de Biotina (proteína de alta afinidad por las inmunoglobulinas) y, finalmente, un complejo de Estrepto-Avidina conjugado con varias moléculas de peroxidasa, que se une a la Biotina (por la alta afinidad de la Estrepto-Avidina por la Biotina).

Para la conservación de la morfología y de la antigenicidad es fundamental el proceso de fijación. Las características de las reacciones inmunocitoquímicas después del empleo de fijadores diferentes han sido analizadas por muchos autores, como Nakane y col. (1989), Hall y col. (1990), Landerbg y Groos (1991), Golick y Rice (1992).

En nuestro estudio hemos utilizado una solución fijadora ampliamente experimentada en nuestro laboratorio, el paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, como demuestran gran número de publicaciones sobre el estudio inmunohistoquímico de la hipófisis, algunas de las cuales se recogen en este trabajo. Así comprobamos que, aún cuando la cantidad de hormona o péptido era pequeña, dicha solución se revelaba como un excelente fijador para el estudio inmunocitoquímico de las hormonas hipofisarias en la rata.

Los controles que hemos realizado están enmarcados dentro de los clásicamente descritos: test de dilución (Sternberger, 1979; Petrusz y col., 1976), test de sustitución de reactivos (Hutson y col., 1979; Forssmann y col., 1981) y, el más común de todos, el test de preabsorción (Hutson y col., 1979; Buffa y col., 1979; Forssmann y col., 1981).

Al sustituir el suero anti-LH por tampón de ensayo y por suero normal de conejo, obtuvimos como resultado la abolición total del producto de reacción.

Realizamos controles de dilución tanto para obtener la concentración más adecuada del primer antisuero como para eliminar tinciones de fondo y otras reacciones; después de un meticuloso test de dilución comprobamos que la dilución óptima del suero específico fue de 1:1200 para el anti-LH.

También hemos realizado preabsorción del suero primario con LH (Sigma®) a razón de 10nM/100 μ l de suero diluido, y en todos los casos obtuvimos la abolición de la reacción.

De esta manera, en nuestro laboratorio se han caracterizado, mediante su expresión inmunocitoquímica, las células productoras de varias hormonas hipofisarias (Carretero y col., 1989; 1990; 1992b; Montero y col., 1990; Rubio y col., 1992; 1994; Sánchez y col., 1993) o productores de péptidos como GRF (Carretero y col., 1991), somatostatina (Gil, 1992) o VIP (Carretero y col., 1992a; 1995b; 1997a).

También se pueden detectar enzimas intracelulares mediante inmunohistoquímica, como hemos hecho en nuestro laboratorio con la aromatasa P450 y la nNOS (Carretero y col., 1999a, b; 2003).

Morfometría y Planimetría.

La segunda técnica empleada en este apartado, la aplicación de métodos cuantitativos morfométricos y estereológicos, intenta resolver el problema de la valoración morfológica subjetiva de la actividad celular. Estos métodos han evolucionado a lo largo de los años; en sus inicios, hace más de treinta años, se empleaban métodos manuales, pero en la actualidad, el empleo de los ordenadores y la digitalización de imágenes permite hacer análisis automáticos o semiautomáticos en los que el operador no interfiere en la medida.

Alrededor de 1850, el geólogo francés Delesse y el microscopista inglés Sorby enunciaron, independientemente, el principio de que el promedio de un área fraccional de un tipo particular de componente, en una sección tomada de un cuerpo sólido, es directamente proporcional a la fracción de volumen de ese componente dentro del cuerpo sólido original (Delesse, 1847; Sorby, 1856).

Estos autores llegaron a esta conclusión por un proceso intuitivo, pero los esfuerzos de expertos en geometría integral y probabilidad han demostrado en varias ocasiones la validez del principio de Delesse (Crofton, 1877; Delthiel, 1926; Bonnesen y Fenchel, 1934; Santalo, 1936; Blaschke, 1949).

Mayhew y Cruz (1973) transformaron el principio de Delesse mediante la consideración de un modelo de esfera concéntrica (toscamente similar a una célula) y consiguieron formulaciones bastante claras de esta relación.

Otros autores también han dejado claro que las ecuaciones usadas en estereología son mera manifestación de un área mucho más amplia de las matemáticas, que se ha denominado geometría multidimensional (Miles, 1972) o simplemente probabilidad geométrica (Little, 1974).

La estereología, término acuñado por la Sociedad Internacional de Estereología (ISA) en 1961, está basada en la probabilidad geométrica y permite la evaluación de estructuras tridimensionales por extrapolación de mediciones realizadas en secciones bidimensionales, tras la aplicación de medidas llevadas a cabo en secciones bidimensionales y axiomas estereológicos, consiguiendo la medida de volumen, superficie

y número de tejidos y componentes celulares con microscopía óptica o electrónica (Rohr y col., 1978).

Los métodos estereológicos son aquéllos que se usan para derivar información tridimensional a partir de la consideración de imágenes bidimensionales. En sentido amplio, esto incluirá métodos de reconstrucción tridimensional usando secciones seriadas así como métodos cuantitativos extrapolables tratados con determinaciones numéricas. Este último concepto ha sido denominado estereología cuantitativa (Underwood, 1970).

Existen bastantes revisiones y artículos que han tratado más a fondo estos temas y, entre ellos, destacamos los de Loud y col. (1965), Weibel y col. (1966), Weibel (1969), Elias y col., (1971), Weibel y Bolender (1973) y Elias y Hide (1980).

Los parámetros abiertos a estudio por los métodos estereológicos incluyen: volúmenes y áreas de superficie de componentes fraccionarios, volúmenes medios, áreas de superficie medias y densidad numérica de diferentes partículas o células dentro de un tejido, así como el tamaño y número de las mismas. Estos volúmenes, áreas, números y tamaños pueden ser estimados a partir de células o tejidos, o bien a partir de porciones de los mismos.

En estereología estricta, los valores para un componente dado son expresados como densidades que relacionan su volumen, superficie o número, con la unidad de volumen de una superficie de referencia dada. En morfometría simple, los valores se expresan como la media aritmética de una población de valores que resulta de tratar estadísticamente las áreas o números referidos a áreas o a poblaciones totales de un parámetro concreto.

Los efectos de tratamientos experimentales sobre la estructura celular y el curso a lo largo del tiempo de distintos eventos morfológicos, pueden ser constatados de forma precisa por medio del volumen, superficie o número de células o de sus organelas. Con ello se evitan en gran medida los aspectos subjetivos y se pueden obtener datos cuantitativos fiables y comparables. Por ello, los métodos estereológicos y morfométricos representan un avance importante en la microanatomía y en la investigación básica morfológica en neuroendocrinología.

En nuestro laboratorio, han sido empleados en numerosas ocasiones técnicas y métodos estereológicos o morfométricos para el estudio de la hipófisis con gran eficacia y precisión, determinando el área celular y el área nuclear de forma semejante a como se ha realizado en este trabajo.

Es obvio que, para determinar la fracción celular en un tejido (porcentaje de células inmunopositivas, en nuestro caso) es muy importante considerar el método empleado para su cuantificación. Los métodos histológicos suelen manejar muchas menos células que la citometría de flujo.

La cuantificación normal a través de microscopio es un método seguro si analiza un número suficiente de células, aunque tiene el inconveniente de consumir mucho tiempo, tanto más cuanto mayor sea la población celular considerada (Barnard y col., 1987; Sheperd y col., 1988; Karamitopoulou y col., 1993). El mayor problema radica en dilucidar cuántas células es necesario contar. Distintos estudios tratan de valorar esta aproximación (Aherne y col., 1977, 1982; García y col., 1987); habiendo empleado métodos semicuantitativos (Gatter y col., 1986; García y col., 1989), así como el análisis de imagen (Schwartz y col., 1989).

En nuestro caso, hemos optado por la cuantificación manual en campos de grandes aumentos para determinar la fracción positiva a LH, estimando que 4000 células por región de la hipófisis, elegidas aleatoriamente, fue un número suficiente para obtener resultados fiables estadísticamente.

Como comprobaremos al comentar los efectos de los distintos grupos de estudio, el marcaje inmunocitoquímico ha permitido comprobar claramente los efectos sobre las células hipofisarias que tienen las situaciones experimentales en nuestro estudio.

Los ratones knock out para la aromatasa (ArKO).

Un detalle importante, dentro del diseño experimental, es el modelo animal que hemos empleado y su aceptación y validación internacional como animal de experimentación.

Para entender la validación del modelo y su elección para la realización de este estudio, en este capítulo de discusión, incluimos los hallazgos bibliográficos que relacionan en la literatura a la aromatasa con la regulación de la hormona LH y, por tanto, de las células hipofisarias que la producen.

En el cerebro existen grandes concentraciones de estrógenos que se sintetizan localmente gracias a la presencia de aromatasa (Cornil y col., 2006). La actividad de esta enzima puede ser modulada rápidamente (en minutos o incluso segundos) por medio de neurotransmisores (Hojo y col., 2004; Balthazart y col., 2006a, Balthazart y col., 2006b). Este mecanismo origina cambios rápidos y transitorios en la concentración local de estrógenos a nivel del cerebro que podrían explicar los efectos rápidos no clásicos ejercidos sobre las neuronas GnRH.

Se ha descrito la presencia de aromatasa en el hipotálamo, concretamente en el núcleo preóptico medial (Balthazart y col., 1993). Estudios recientes han demostrado que el pico de GnRH y LH inducido por estradiol es normal en los ratones hembras *knock out* para aromatasa, lo que sugiere que, en ellos, la producción local de estrógenos no juega ningún papel en el feedback positivo sobre las neuronas GnRH (Szymanski y col., 2012).

En los ratones *ArKO* hembras el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal está alterado debido a la privación de estrógenos. Estos animales presentan concentraciones de gonadotropinas más elevadas que los ratones *wild type* (wt), probablemente como resultado de esta ausencia de retroregulación negativa, ya que cuando se les administra una dosis baja de estradiol la concentración de LH plasmática disminuye hasta niveles fisiológicos (Britt y col., 2000, Liew y col., 2010).

Este hallazgo es consistente con la elevación de FSH y LH circulantes que se observan tras la ovariectomía o en la menopausia, periodos ambos que se caracterizan también por la desaparición de los estrógenos sobre el eje gonadal. No obstante, como ya se ha señalado anteriormente, los efectos ejercidos por los estrógenos sobre los niveles séricos de FSH y LH son complejos.

A este respecto, existe una total concordancia en la relación del aumento de gonadotropinas en sangre por la ausencia de la aromatasa con los hallazgos observados en nuestro estudio en mujeres tratadas con antagonistas de la aromatasa, en las que los niveles de LH sérica se encontraban elevados.

El mecanismo de retroregulación de la LH ha sido estudiado en ratones hembra α ERKO y $\alpha\beta$ ERKO. Ambos tipos muestran niveles de LH elevados en comparación con los ratones *wild type* y β ERKO. No obstante, la participación del sistema inhibina / activina y otros reguladores hacen que este circuito de control sea mucho más complejo (Couse y col., 2003).

En el ovario, la acción autocrina del 17-beta estradiol, (principal estrógeno bioactivo), es mediada por los dos receptores (ER1 o alfa y ER2 o beta), cuya presencia ha sido demostrada en las células de la granulosa de ratón, primates y humanos (Drummond y col., 1999; Saunders y col., 2000).

Como ya se ha señalado, en el ovario, la aromatasa está localizada en las células de la granulosa. La testosterona y la androstendiona son producidos por las células de la teca en respuesta a la LH y se transportan a la granulosa, donde ocurre la aromatización. Los estrógenos estimulan la proliferación de las células de la granulosa y facilitan la diferenciación de estas células inducida por la FSH y LH (Richards , 1980; Robker y col., 1998).

Los ratones Arko hembra son infértiles debido a la alteración de la folículogénesis y a la incapacidad para ovular, como muestra la ausencia de cuerpos lúteos. La anovulación puede deberse también a los niveles persistentemente elevados de LH y a la ausencia del pico preovulatorio de ésta. Fruto de esta exposición crónica a la LH, sus ovarios presentan hiperplasia del estroma y quistes hemorrágicos (Britt y col., 2000).

Puede concluirse, por tanto, que el fenotipo ovarico de los ratones ArKO puede atribuirse a un ambiente hormonal alterado fruto de la ausencia de aromatasa que impide la conversión de andrógenos a estrógenos. Sin embargo, esta morfología no concuerda exactamente con la del síndrome de ovario poliquístico (SOP) de los humanos, porque no presentan engrosamiento de la teca interna.

Esta infertilidad, junto a las alteraciones testiculares de los machos ArKO que también les hace infértiles nos ha obligado a utilizar progenitores heterocigóticos para obtener ratones machos y hembra ArKO para nuestro estudio.

En los ratones *wild type* machos, un 20 % de los estrógenos plasmáticos son producidos por los testículos. También se ha demostrado que sus células germinales y los espermatozoides poseen actividad aromatasa, lo que sugiere que existe una modulación testicular por parte de los estrógenos (Janulis y col., 1998).

En los ratones ArKO machos los niveles séricos de testosterona son más altos que en los *wild type*, y esta diferencia se mantiene en todas las edades (Fisher y col., 1998). En primates y perros, la supresión de la aromatización también origina un aumento de la concentración de LH (Trunet y col., 1993).

En la especie humana, los estudios realizados en varones con mutaciones que inactivan los genes de la aromatasa muestran un aumento de las concentraciones séricas de FSH y LH (Carani y col., 1997).

La administración de un inhibidor no esteroideo de la aromatasa a varones control también induce un rápido aumento de los niveles de FSH y LH (Hayes y col., 2000). Según esto, como ya se ha comentado anteriormente, tanto la testosterona como el estradiol jugarían un papel en el feedback negativo regulador de LH.

Los hallazgos que acabamos de detallar ponen de manifiesto que el modelo experimental empleado en nuestro estudio es un modelo aceptado y validado para el estudio de la hipófisis reproductora y, en particular, para el estudio de las células hipofisarias productoras LH.

Siendo éste el primer estudio realizado sobre los cambios que acontecen en este tipo celular hipofisario ante la ausencia total de estrógenos por no producirse la aromatasa P450. Lo que le da una gran importancia en la investigación traslacional y otorga el carácter de originalidad que debe aportar todo trabajo de Tesis Doctoral.

En las ratas macho la situación parece ser diferente, ya que la administración de un inhibidor de la aromatasa no esteroideo durante un corto periodo de tiempo produce un aumento de la FSH pero no altera las concentraciones plasmáticas de LH. Además, el aumento de la FSH ocurre en ausencia de cambios detectables en la concentración de estradiol, por lo que cabría pensar que este *feed back* negativo se lleva a cabo por medio de la aromatización local de la testosterona dentro del hipotálamo y la hipófisis.

Para aclarar el mecanismo de acción de los andrógenos sobre el cerebro (directamente por medio de receptores de testosterona o indirectamente a través de los receptores de estrógeno previa aromatización a estradiol) se han empleado ratones machos *knock out* para receptores de estrógenos (ER1KO y ER2KO). Los ratones mostraron una ausencia completa de apareamiento y comportamiento territorial a pesar de que los niveles de testosterona eran normales. Este hallazgo sugiere, por tanto, que la acción de los andrógenos requiere su transformación en estrógenos por parte de la aromatasa (Juntti y col., 2010).

A nivel clínico, los inhibidores de la aromatasa de tercera generación han demostrado su utilidad para el tratamiento de ciertas enfermedades estrógeno-dependientes tales como el cáncer de mama y la endometriosis (Bulun y col., 1999).

Sin embargo, tienen la desventaja de que inhiben de manera global la actividad de la aromatasa, por lo que poseen efectos no deseados en aquellos lugares donde se requiere la presencia de estrógenos para mantener la función normal (mineralización de los huesos, función cognitiva, etc).

El anastrozol (Arimidex, Astra Zeneca) es un inhibidor de la aromatasa de cuarta generación, no esteroideo, potente y altamente selectivo, que se ha desarrollado para el tratamiento del cáncer de mama en mujeres postmenopausicas (Plourde y col., 1994). Es capaz de inhibir la síntesis de estrógenos sin afectar a ninguna de las otras enzimas implicadas y no posee actividad hormonal intrínseca (Dukes y col., 1996).

Este ha sido el inhibidor utilizado en nuestro estudio y, como ya hemos comentado anteriormente, ha provocado el aumento de las tasas séricas de LH que cabía esperar.

Comentarios sobre los resultados obtenidos.

Ausencia de la aromatasa P450 y génesis de adenomas hipofisarios.

En general, los adenomas pituitarios constituyen el 15% de los tumores intracraneales. Aunque se consideran benignos, son causa de una morbilidad importante debido, al incremento de secreción hormonal y a una posible comprensión de estructuras vecinas a la silla turca (Asa y Ezzat, 1998; Kaltsas y Grossman, 1998; Levy y Lightman, 2003; Ragel y Couldwell, 2004; Horvath y Kovacs, 2008).

Según Asa y Ezzat (1998) y Kovacs y col. (2001) y teniendo en cuenta las características morfológicas y secretoras de la adenohipófisis, se diferencian los siguientes tipos de adenomas, por orden de frecuencia: Prolactinomas (si hay exceso de secreción de hormona prolactina), GHomas o somatotrofinomas (exceso de secreción de hormona GH, unido normalmente a la enfermedad de acromegalia o gigantismo), ACTHomas (unido a la secreción de hormona ACTH en enfermedad de Cushing's), adenomas no funcionantes (o adenomas que no presentan exceso de secreción de ninguna hormona, ni signos endocrinológicos) y los menos frecuentes, los adenomas que secretan bien TSH, bien gonadotropinas o bien aquellos que secretan más de una hormona. Sin embargo, hemos de decir que los adenomas pituitarios pueden ser muy heterogéneos y con dificultad de tipaje en muchos casos (Kovacs y col., 2001).

En la clasificación de los adenomas antes expuesta, también se ha de tener en cuenta, la llamada secreción paradójica (Cantalamesa y col., 1976; De Marinis y col., 1990). La secreción paradójica es aquella que se produce cuando una célula adenohipofisaria determinada responde a una hormona hipotalámica que no es la específica de dicha célula; ello es debido a que la adenohipófisis contiene, además, algunas células multifuncionales de secreción no ortodoxa y que elaboran dos hormonas adenohipofisarias (células polihormonales) y que responden a varias hormonas hipotalámicas liberadoras (células de múltiple respuesta) y este tipo celular puede estar involucrado en la secreción paradójica y además, en la llamada «*transdiferenciación*» o cambio en el fenotipo celular de estas células, sin que exista división celular (Losa y col., 1985; Cordido y col., 1994; Ámsterdam y col., 1982; Fischer y col., 1992; Villalobos y col., 2004).

Como ha quedado expuesto anteriormente, los tumores hipofisarios, fundamentalmente los adenomas, constituyen entre el 10 y el 15% de todos los tumores intracraneales (Ishibashi y Yamaji, 1985; Sarkar, 2006). Los prolactinomas son los adenomas más frecuentes y son considerados como tumores monoclonales, que afectan a una sola estirpe celular de la hipófisis, las células de prolactina (Prezant y Melmed, 2002; Clayton y Farrel, 2004) lo que implicaría que pueden existir factores moleculares intrínsecos en las células de prolactina que darían origen al tumor.

Los adenomas pituitarios productores de gran cantidad de Prolactina se denominan prolactinomas y son de los más numerosos. Son los más frecuentes de la hipófisis (Ishibashi y Yamaji, 1985). Uno de cada 2800 hombres y una de cada 1050 mujeres se considera que poseen prolactinomas. Entre ellos tenemos los adenomas y los carcinomas secretores de Prolactina. Se admite también que algunos pacientes con acromegalia, son portadores de adenomas mixtos, al segregar hormona del crecimiento y prolactina (Sarkar, 2006).

Como hemos dicho antes, los adenomas son tumores benignos y los carcinomas presentan malignidad. La iniciación, desarrollo y progresión de los adenomas y su posible paso a carcinomas hipofisarios, no es del todo conocida (Donangelo y Melmed, 2008); Una alteración del ciclo celular, la angiogénesis (Melmed, 2003; Levy y Lightman, 2003; Scheithauer y col., 2006), así como de determinados cambios moleculares en diversas proteínas están siendo analizados.

Los adenomas pueden ser considerados, como funcionantes, si secretan gran cantidad de hormona o como endocrinológicamente inactivos al no secretar hormonas u hormonas inactivas. Además, según el tamaño, como microadenomas y como macroadenoma; si su diámetro es mayor de 1cm hablamos de macroadenoma y, en caso contrario, como microadenoma, no importando los datos endocrinos que presenten, según Bevan (2008). La macroadenomas se diagnostican bien mediante técnicas de imagen, mientras que los microadenomas es más complicado, necesitando medios adecuados para obtener imágenes de gran resolución; sin embargo, mediante técnicas bioquímicas el diagnóstico es fácil y sencillo.

El patrón de crecimiento de estos tumores puede ser, expansivo, dando lugar a un crecimiento de la masa tumoral que, a su vez, provoca un aumento de presión sobre el tejido normal de la hipófisis y sobre la silla turca; también puede ser un crecimiento invasivo, rápido, alcanzando no solo el tejido normal de la glándula sino también la dura madre y estructuras parasellares, como el seno esfenoidal y seno cavernoso e incluso alcanzar el quiasma óptico y provocar alteraciones en el campo visual del paciente. Es muy raro que alcance la fosa posterior o la nasofaringe (Kovacs y col., 1991; Vance, 2003; Kovacs y Horvath, 2005)

El problema de la vascularización es un hecho constatado en diversos tumores. Se admite que la vascularización es menor en los tumores hipofisarios en relación con las hipófisis normales, cosa que no ocurre en otros tipos de tumores, como el de próstata, mama, estómago, donde hay un incremento de la angiogénesis; sin embargo, concretamente en los prolactinomas, la vascularización es más manifiesta que en otros tumores hipofisarios, como los adenomas que producen la hormona GH o FSH (Turner y col., 2003).

Tanto los macroprolactinomas, los prolactinomas invasivos o los carcinomas tienen una densidad de vasos superior a los que poseen los microadenomas, adenomas no invasivos u otros adenomas hipofisarios. Ello puede darnos una pista sobre un origen diferente de los microadenomas y macroadenomas (Turner y col., 2003).

La iniciación, desarrollo y progresión de los adenomas y su posible paso a carcinomas hipofisarios, no es muy conocida (Donangelo y Melmed, 2008).

Los factores que pueden dar lugar a la génesis de los adenomas en general y de los prolactinomas en particular son múltiples.

Se sabe que, en general, el envejecimiento es causa de la aparición de adenomas; se ha comprobado en ratas viejas, aunque dependiendo de la cepa estudiada, la existencia de adenomas hipofisarios espontáneos en ratas maduras, la mayoría prolactinomas, entre un 10 y un 86% (Sarkar y col., 1983). En nuestro laboratorio hemos encontrado un porcentaje alto de adenomas espontáneos en ratas viejas, siendo la mayoría prolactinomas (Carretero, 2002).

Los E2 han sido muy estudiados como causa de inducción de tumores hipofisarios productores de prolactina (Sadoul y col., 1992). En ratas de ambos sexos, elevados niveles de E2 en suero y durante largos periodos de tiempo, causan hiperplasia y/o adenomas (DeNicola y col., 1978. Wicklund y col., 1981).

En humanos transexuales, que recibieron fuertes dosis de estrógenos, aparecieron prolactinomas (Gooren y col., 1988) Y existen evidencias claras de un crecimiento, tanto de micro como de de macroprolactinomas, durante la terapia con estrógenos (Garcia y Kapcala, 1995).

Mujeres que tomaron contraceptivos orales mostraron niveles altos de PRL (Carol y col., 1988) Y aquellas que tomaron estrógenos para el tratamiento de irregularidades en la menstruación, la incidencia de prolactinomas fue de 7 a 8 veces más alta (Shy y col., 1983). Estos datos sugieren que algunas mujeres son más sensibles a los efectos lactogénicos de los estrógenos exógenos y pueden tener más riesgo del desarrollo de prolactinomas (Luciano y col., 1985) lo que sugiere una base génica predeterminante.

Las células de secreción paradójica debido a la transdiferenciación, como antes apuntábamos, pudieran ser un factor de iniciación de los adenomas hipofisarios (Senovilla y col., 2004).

Otro factor a tener en cuenta, es una más de las causas que se señalan, en la génesis de los adenomas, es la angiogénesis (Melmed, 2003; Levy y Lightman, 2003; Scheithauer y col., 2006). Es cierto que la vascularización es menor en los tumores hipofisarios en relación con las hipófisis normales, cosa que no ocurre en otros tipos de tumores, como el de próstata, mama, estómago, donde hay un incremento de la angiogénesis; sin embargo, la vascularización en los adenomas que segregan PRL es más manifiesta que en otros tumores hipofisarios, como los adenomas que producen la hormona GH o FSH (Turner y col., 2003).

Un posible paso de adenomas a carcinomas no es descartado en su globalidad. Si hablamos de la génesis de los carcinomas pituitarios se consideró que los medios terapéuticos empleados para extirpar los adenomas hipofisarios, tales como la hipofisectomía transfrontal o transesfenoidal o la radioterapia, era la causa de dichos tumores; sin embargo, no hay ninguna evidencia que demuestre este punto de vista (Kaltsas y Grossman, 1998; Ragel y Couldwell, 2004; Taylor y col., 1994; Brada y col., 1992).

Una presentación de los carcinomas sin ningún antecedente previo no puede excluirse (Nose-Alberti y col., 1998; Roncaroli y col. 2003); la transformación de los macroadenomas en carcinomas necesita un largo tiempo de evolución (Wilson, 1982; Mountcastle y col. 1989; Pernicone y col., 1997; Kaltsas y Grossman, 1998; Lloyd y col. 2004) con la consecuente aparición de modificaciones genéticas (Mountcastle y col., 1989; Kaltsas y Grossman, 1998; Ragel y Couldwell, 2004), sabiéndose que en el primitivo estado proliferativo aparezcan mutaciones monoclonales o policlonales y alteraciones de oncogenes, así como de genes supresores de tumores (Kaltsas y Grossman, 1998; Zahedi y col., 2001; Asa y Ezzat, 2002).

Las alteraciones genéticas están involucradas en la génesis y progresión de los prolactinomas, incluyendo la pérdida de genes supresores de tumores, la sobreexpresión de oncogenes y la expresión anormal de proteínas y moléculas intrínsecas, que mantienen la estabilidad de los cromosomas.

En el trabajo que presentamos hemos realizado, con el objeto de poder añadir algún dato nuevo en el conocimiento de la génesis de los adenomas hipofisarios, la relevancia que puede tener la aromatasa en la génesis de los adenomas hipofisarios espontáneos que se desarrollan en el envejecimiento.

En este aspecto, el estudio que presentamos es una parte de otro mas amplio desarrollado dentro de nuestro Departamento, por supuesto con el mismo objetivo, el estudio de la génesis de los adenomas humanos.

En adenomas espontáneos de rata, Carretero y colaboradores (2002) demostraron que la aromatasa P450 se sobreexpresaba en la totalidad de los prolactinomas. Más tarde Larrinaga (2011) estudiando adenomas hipofisarios humanos no inducidos comprobó que dentro de una serie de 87 adenomas el 55% de ellos (48 tumores) fueron PRL positivos y que todos los prolactinomas estudiados fueron aromatasa positivos.

El nuevo dato que aportamos a este respecto es que los animales knock out para la aromatasa, ya sean machos o hembras, no desarrollan adenomas hipofisarios espontáneos, al menos a las edades de aparición en los animales wild type, lo que vuelve a poner de manifiesto la relevancia del papel que la aromatasa puede desempeñar en la génesis de estos tumores.

Localización regional dentro de la hipófisis de las células positivas a LH.

Distintos grupos de investigadores han tratado de definir la distribución intrahipofisaria de las células gonadotropas, describiendo áreas con una mayor densidad de células de esta estirpe, cuya localización varía en función de la especie estudiada.

Phifer y col. (1973) comprobaron, en el hombre, una mayor densidad de células gonadotropas en la porción posteromedial de la hipófisis adyacente al lóbulo neural. Holmes (1963) en hurones y Anthony y Gustafson (1984) en murciélagos, localizaron acúmulos de estas células en torno al tallo infundibular.

En la rata adulta, la zona sexual, un área rica en células gonadotropas, ha sido descrita en la región cráneo-ventral de la pars distalis (Purves y Griesbach, 1951; Nakane, 1970 y Baker y col., 1972), aunque Yoshimura y col. (1981) la localizan en la región dorso-cefálica de la hipófisis. Sin embargo, en el período perinatal, esta área, en la que se concentra la población gonadotropa, se localiza en la porción ventro-medial (Watanabe 1986).

Estas localizaciones "especializadas" de las células gonadotropas dentro de la hipófisis no implican que haya células gonadotropas por el resto de la glándula, no obstante por la mayor densidad celular se trató de asociar la llegada de GnRH (antiguo LHRH) a lugares concretos del sistema porta hipofisario con la terminación de dichos vasos en la glándula y que en esos lugares hubiera más células gonadotropas.

La mayoría de las fibras GnRH terminan en la proximidad de los capilares del plexo porta primario de la zona externa de la eminencia media y son muy escasas en el tallo hipofisario, estando restringidas en éste a su parte anterior (Anthony y col., 1984).

El camino que debe seguir la GnRH hasta alcanzar la adenohipófisis fue perfilado por un grupo de laboratorios a finales de los años treinta (Friedgood, 1937; Harris, 1937; Haterius, 1937; Hissey, 1937), años más tarde Green y Harris (1947) postularon que el hipotálamo regulaba la función adenohipofisaria por medio de la liberación humoral, a través de los vasos porta.

Al plantear la posibilidad de un diferente aflujo de factores estimuladores hipotalámicos a los distintos territorios hipofisarios, es necesario considerar que, desde la eminencia media y el tallo infundibular, los vasos porta largos se dirigen hacia la pars distalis abordándola por su polo anterior, y los vasos porta cortos desde las porciones posteriores del tallo y el proceso infundibular, tras atravesar la pars intermedia y la caverna hipofisaria (Page y col., 1976), entran en la pars distalis por su porción dorsal. Además, hay otro grupo de vasos porta (Koritke y Dubernoy, 1960) que, desde la región del tallo hipofisario, curvándose a los lados de la pars intermedia, pero sin atravesarla, llegan a la pars distalis abordándola también por su superficie dorsal.

Considerando la localización de las fibras GnRH y la distribución del sistema vascular, así como que del 70 al 90% del flujo de la pars distalis tiene lugar a través de los vasos porta largos (Porter y col., 1974), se puede considerar que la vía de acceso de la GnRH hacia la hipófisis ha de ser a través del sistema de vasos porta largos y de los vasos porta descritos por Koritke y Dubernoy (1960).

Pudiendo descartarse la implicación del sistema de vasos porta cortos en el transporte de GnRH hasta la pars distalis, atendiendo a su distribución y a la posibilidad de que en ellos el flujo se dirija de adeno a neurohipófisis (Baertschi, 1980).

Sin embargo, han habido muchas controversias y discusiones sobre las variaciones en su estructura del sistema porta hipofisario y en la relación entre un vaso y una región, cuando además los sinusoides hipofisarios forma una malla o red vascular (Green y Harris, 1947).

Por otra parte, es necesario mencionar la hipótesis de LI y col., (1984) sobre la existencia de dos poblaciones de células gonadotropas hipofisarias, en función de la fuente de LHRH que las nutre. Así, ellos describen que, independiente de la fuente de LHRH hipotalámica, existe una población intrahipofisaria de LHRH, que se localiza en la PI y porción dorsal de la pars distalis, que actuaría sobre las células gonadotropas localizadas en el territorio de los vasos porta cortos. Esta fuente intrahipofisaria de LHRH podría muy bien servirse del sistema portal intraadenohipofisario descrito por MURAKAMI y col. (1985), que es por completo independiente del clásico sistema portal neuro-adenohipofisario.

Los estudios de Baker y colaboradores (1975) y de Carbajo y colaboradores (1987a) demostraron que en los sectores anterior y dorsal de la pars distalis de la rata adulta, independientemente del sexo y antisuero utilizado, el número de células gonadotropas por unidad de superficie es mayor que en el resto de la glándula.

Diversos estudios, con diferentes resultados han tratado de cuantificar los porcentajes totales de células positivas a LH o FSH (Moriarty, 1973; Dada y col., 1974; Jansen, 1982; Rubio, 1987)

Watanabe (1981, 1986) sólo encontró en algunas muestras una concentración de células inmunoteñidas en el borden ventral de la pars distalis cuya presencia era menos frecuente y con menos células que la descrita en la porción dorsal, aunque en los

períodos fetal y postnatal, las células gonadotropas se encuentran preferentemente en la porción ventromedial de la hipófisis (Watanabe, 1981, 1986).

Estas diferencias de localización y porcentajes podrían guardar relación con el papel de la GnRH en la citodiferenciación de las células gonadotropas (Begeot y col., 1983 y 1984; y Watanabe, 1985).

Las diferencias de localización se acompañan de diferencias en el tamaño de las células gonadotropas (Fellman, 1982; Nekane, 1970; Tougard y col., 1973 y 1980; Rubio, 1987).

Estos estudios clásicos nos hicieron pensar en la necesidad de abordar el estudio de la repercusión que la ausencia de aromatasa P450 pudiera tener sobre las células positivas a LH en ratones, especie poco estudiada en lo que se refiere a la localización celular en la hipófisis de una manera especial, no siendo que una consideración global de la glándula pudiera conducirnos a errores conceptuales de partida.

Por ello, en animales wild type machos y hembras realizamos un estudio de localización de las células gonadotropas que nos llevó a diferenciar distintas zonas a estudiar, que si bine no eran idénticas dependiendo del sexo, se aproximaban mucho.

Así diferenciamos las siguientes regiones que hemos estudiado de craneal a caudal: dorsal tuberal, dorsal, lateral, polar, ventral lateral, ventral medial, medial próxima a la pars intermedia, central medial, central lateral y dorsal infracavitaria.

Estra precaución inicial, como han demostrado los resultados obtenidos ha sido esencial ya que las características morfológicas y morfométricas, y los porcentajes de células positivas a LH han sido diferentes de unas a otras.

La siguiente tabla resume como positivos los cambios estadísticamente significativos entre wild type y knock out para cada una de las regiones en la valoración cuantitativa realizada en nuestro trabajo.

		DT	D	L	P	VL	VM	MPI	CM	CL	DICAV
MACHOS	AREA	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	%	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
HEMBRAS	AREA	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
	%	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-

Este resumen pone de manifiesto que fueron las porciones más laterales de la hipófisis las más afectadas por la ausencia de estrógenos derivada de la ausencia de la aromatasa.

Además, con pequeñas variaciones, se puede observar que los cambios fueron semejantes en machos y hembras.

También demuestra que, de existir un área sexual en la hipófisis, ésta no se circunscribe a regiones dorsales y anteriores, ya que las regiones ventral lateral y

central lateral responden claramente a la ausencia total de estrógenos, al menos en el ratón.

Partiendo de que se ha demostrado que la capacidad de liberar LH es unas 20 veces mayor en las células gonadotropas grandes que en las pequeñas, como demostraron Denef y col (1978) y que, en general los aumentos de volumen o de área de las células hipofisarias son indicativos de mayor actividad y liberación hormonal (Poole y col. 1980; Carretero 1984).

El aumento del tamaño de las células positivas a LH que presentan los animales knock out estudiados en nuestro trabajo nos permite concluir que la ausencia crónica de estrógenos conduce a un estímulo mantenido de las células hipofisarias positivas a LH. Este hecho se ve corroborado por los aumentos significativos del tamaño del núcleo de estas células.

Puesto que cualquier resultado experimental obtenido por ablaciones in vivo o por el análisis de variaciones cíclicas en hembras se ve influido por las importantes variaciones que experimenta la hipófisis gonadotropa, en función de la edad, sexo y estado endocrino del animal (Watanabe y col. 1985 y Watanabe 1986 b), el modelo experimental empleado en nuestro estudio es crucial para determinar el papel real de los estrógenos en machos y hembras en la regulación de LH ya que ante la ausencia de la aromatasa no hay fuentes posibles de estrógenos ya sean gonadales o no.

Variaciones morfológicas de las células positivas a LH.

La adenohipófisis segrega varias hormonas que, a través del torrente sanguíneo, actúan sobre órganos diana, estimulando su secreción. Desde antiguo se pretendió asociar la síntesis de cada una de estas hormonas, con un determinado tipo celular empleando para ello diversas técnicas histoquímicas (Schoneman, 1892; Bailey y Davidoff, 1925; Romeis, 1940; Halmi, 1952; Purves y Griesbach, 1951, 1956; Adams y Swetienham, 1958; Pearse y Van Noorde, 1963; Herlant, 1964).

Ello dió lugar a la aparición de múltiples terminologías, hasta que en la Reunión del Comité Internacional para Nomenclatura de la Adenohipófisis (Van Oordt, 1965) se estableció una clasificación funcional, relacionando el tipo celular con la hormona que produce. Sin embargo hoy se sabe que no todas las células de la hipófisis se ajustan a esta clasificación funcional por segregar más de una hormona o porque producen muchas más sustancias que las hormonas adenohipofisarias clásicas.

Los primeros trabajos en relación con las células gonadotropas datan del año 1905 y fueron hechos por Fichera quien observó los cambios acaecidos en la hipófisis de ratas tras la castración y su total normalización al inyectar extractos gonadales.

EL empleo y desarrollo de diferentes técnicas histoquímicas, parcialmente difíciles de estandarizar, condujo a discusiones y controversias relativas a cómo identificar las células gonadotropas (Guyer y Claus, 1937; Severinghaus, 1937; Smelser, 1944; McManus, 1946; Hotchkiss, 1948; Catchpole, 1949; Purves y Griesbach, 1954; Halmi, 1950; Purves y Griesbach, 1951; Siperstein y col., 1954; Knigge, 1955; Barrnet y col., 1956; Herlant, 1960; Bain y Ezrin, 1970; Dev y Srivastava, 1975). Aunque todo ello supuso un gran avance en el estudio de la hipófisis, se llegaron a publicar errores como las conclusiones obtenidas por Purves y Griesbach (1954) y Siperspetein y colaboradores (1954), que analizando la respuesta de las células gonadotropas a la administración de testosterona y su evolución, desde el nacimiento a la pubertad, llegaron a la conclusión, de que las células situadas en el centro de la glándula eran productoras de LH y las de la periferia de FSH.

Nakane (1970) , mediante el uso de técnicas inmunocitoquímicas, dio un vuelco a la identificación de las células hipofisarias y comprobó que las células que contienen LH y FSH están distribuidas de forma idéntica por toda la hipófisis anterior, incluyendo las áreas adyacentes al lóbulo intermedio. En general, admite que las células periféricas contienen ambas hormonas mientras que las del centro tienden a contener solamente una de ellas. Tougard y col. (1971) demostraron, con técnicas inmunocitoquímicas a microscopía óptica, que las células gonadotropas reaccionan con los antisueros anti LH ovina y que esas mismas células, con métodos histoquímicos, como el azul alcian PAS, toman el color violeta.

Baker y col. (1972) y Tougard y col. (1973), teniendo en cuenta su forma y localización dividen a las células gonadotropas LH en dos poblaciones: Células grandes, que están localizadas preferentemente en la parte lateral y anterior de la pars distalis. Células pequeñas, distribuidas por toda la pars distalis, pero más numerosas en la parte posterior. Philfer y col. (1973), mediante la combinación de técnicas de inmunocitoquímicas, tricrómicas y tetracrómicas en la hipófisis humana, y Herbert (1975), mediante inmunocitoquímica, demostraron que las hormonas FSH y LH se encuentran en la misma célula gonadotropa y mediante histoquímica evidenciaron que en su citoplasma hay dos poblaciones de gránulos.

Más tarde, Herbert (1976, 1978) confirmó en primates que ambas hormonas están contenidas en la misma célula; las células eran de forma ovoidea o esférica, con núcleo excéntrico, no encontrando variaciones en cuanto al sexo, y distribuidas uniformemente por toda la pars distalis de forma aislada o, más raramente, formando grupos.

Por el contrario, Girod y col. (1980, 1981), en otras familias de monos, demuestran, utilizando las mismas técnicas, que el 85% de las células gonadotropas reaccionan para LH y FSH, mientras que el 10% lo hace sólo para LH y el 5% sólo para FSH.

En el ratón, Baker y Gross (1978) demostraron que la mayoría de las células gonadotropas tienen forma poliédrica y que algunas tienden a ser ovoideas y son más grandes. Están distribuidas por toda la glándula acumulándose en la zona sexual. Las más grandes se sitúan preferentemente en la zona periférica y contienen más vacuolas citoplásmicas en el macho que en la hembra. La mayoría de las células contienen ambas hormonas. Hallazgo que fue definitivamente confirmado por Inoue y Kurosumi (1984), al demostrar que todas las células gonadotropas son capaces de sintetizar y liberar FSH y LH.

Nuestros resultados en el ratón confirman la distribución por toda la glándula de las células positivas a LH y confirman que su forma más frecuente es la de poligonal o redondeada; No obstante, el estudio detallado de todas las regiones analizadas en nuestro estudio ponen en duda la existencia de una zona sexual dorsal y anterior y que las células de mayor tamaño sean sólo periféricas.

En nuestro estudio queda manifiestamente demostrada la asociación de la polaridad nuclear, la existencia de una imagen negativa del aparato de Golgi, la de vacuolizaciones cisternales del retículo endoplásmico rugoso y la apariencia granular gruesa de la reacción inmunoquímica en el citoplasma celular, junto a los aumentos en las áreas celular y nuclear, como signos evidentes a microscopía óptica de un aumento de actividad celular. Todos ellos se asocian junto al aumento en el porcentaje de células positivas a LH a la desaparición del feed back inhibitor de los estrógenos por ausencia de la aromatasa.

Implicación del déficit de aromatasa en la regulación de la LH en los machos.

Que los estrógenos son el elemento de feed back inhibitor en la hembra es fácilmente comprensible y está suficientemente demostrado, como ha quedado patente en el capítulo de introducción de este trabajo.

Sin embargo, que los estrógenos jueguen un papel semejante en los machos, como sugieren los resultados obtenidos en este estudio, precisa de una reflexión y una explicación más detallada.

Los efectos de la testosterona sobre la secreción de las hormonas gonadotropas es en principio inhibitor. Se ha descrito que in vivo la testosterona inhibe la secreción de FSH (Winters y col., 1979). Sin embargo, en ausencia de la regulación hipotalámica, los efectos sobre la hipófisis parecen ser opuestos, así la testosterona parece estimular la secreción de FSH (Bhasin y col., 1987) estimulando la producción de la subunidad β y de su mRNA (Wierman y Wang, 1990).

La regulación androgénica de LH se desarrolla fundamentalmente en el hipotálamo. Actuando directamente sobre receptores androgénicos, la testosterona inhibe la síntesis de la subunidad α de la LH en las células gonadotropas de la hipófisis. Indirectamente, a través del hipotálamo (Finkelstein y col., 1991), inhibe la secreción de LH. El efecto inhibitor de la testosterona sobre LH no precisa de su reducción a andrógeno no aromatizable por actuación de la 5α reductasa (Gormley, 1992).

Las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo de los machos presentan receptores androgénicos y receptores estrogénicos α que parecen mediar la inhibición que ejerce la testosterona sobre las neuronas productoras de kisspeptina que, a su vez, intervendrían en los efectos inhibidores de la testosterona sobre la secreción de GnRH (Smith y col., 2005; Dungan y col., 2006).

La frecuencia en la pulsatilidad de la liberación de GnRH es importante de cara a que un mismo tipo celular hipofisario, las células gonadotropas, respondan sintetizando y liberando preferentemente FSH o LH (Wildt y col., 1981; Haislender y col., 1991; Kaiser y

col., 1997; Ferris y col., 2006). Fisiológicamente, los estrógenos parecen acelerar el pulso de GnRH (Filicori y col., 1986), lo que favorecería la liberación de LH (Wildt y col., 1981).

Para analizar los efectos que se derivan de la ausencia de estrógenos en los animales knock out para la aromatasa P450 es sumamente interesante detenernos a describir brevemente el mecanismo de retroregulación de los estrógenos sobre la secreción de LH (Kaiser, 2011), las vías no clásica y clásica de regulación estrogénica.

Los estrógenos actuando sobre receptor estrogénico α inhiben en el núcleo arcuato la liberación pulsátil de GnRH e inhiben la acción estimuladora sobre GnRH de la kisspeptina (Smith Y col., 2005; Bianco y col., 2009; Roseweir y Millar, 2009). Esto bloquearía el aumento de calcio intracelular y la movilización del calcio dentro de la célula que acontece como resultado de la activación del receptor de GnRH. La consecuencia final es que el estímulo liberador del GnRH sobre la secreción de LH y FSH quedaría bloqueada. A ello se suma que de forma directa los estrógenos inhiben en las células gonadotropas la secreción de LH y FSH.

Esto no ocurre en la regulación del pico preovulatorio de LH. En la fracción ventral anterior del núcleo paraventricular, los estrógenos, a través de receptores estrogénicos α , estimulan la kisspeptina que a su vez estimula la pulsatilidad de GnRH, favoreciendo la liberación de LH (Kaiser, 2011).

La presencia de aromatasa P450 en la hipófisis de roedores y humana ha sido demostrada desde nuestro laboratorio, siendo nuestros estudios los primeros a nivel mundial que evidenciaron este hecho biológico (Carretero y col., 1999). Muy recientemente hemos comprobado que el bloqueo de la actuación del enzima provoca cambios paracrinós importantes en la hipófisis de la rata (García-Barrado y col., 2014).

Dado que la aromatasa se produce localmente en la hipófisis y que es más abundante en machos que en hembras (Carretero y col., 1999) y que los andrógenos aromatizables son capaces de inhibir LH bloqueando su reducción a andrógenos no aromatizables (Gormley, 1992), es perfectamente factible hipotetizar que su transformación a estradiol a nivel local es un hecho fisiológico implicado en la inhibición de LH que desaparece cuando en nuestro estudio esta metabolización ha desaparecido por la ausencia total del enzima.

Puesto que hemos podido comprobar un aumento evidente de actividad en las células positivas a LH de los machos knock out para la aromatasa, la hipótesis planteada anteriormente se ve corroborada y sugiere que gran parte del efecto inhibitorio de los andrógenos sobre las células positivas LH se debe a la aromatización de los andrógenos.

Inhibidores de la aromatasa en la práctica clínica. Efecto sobre la secreción de LH.

El uso de inhibidores de la aromatasa para el tratamiento de cáncer de mama se limita a las pacientes postmenopáusicas, ya que en ellas la síntesis de estrógenos es fundamentalmente extragonadal.

En las mujeres premenopáusicas, los inhibidores de la aromatasa no suprimen adecuadamente la producción de estrógenos. La cantidad de aromatasa que existe en el cerebro y en los tejidos periféricos es pequeña en comparación con los elevados niveles que poseen las células de la granulosa. Por lo tanto, es probable que en la mujer fértil se inhiba totalmente la actividad de este enzima en todos los tejidos excepto en el ovario, donde solo ocurriría un bloqueo parcial. La respuesta compensatoria a esta depleción de estrógenos en el hipotálamo daría lugar a una mayor secreción de FSH con el consiguiente aumento del reclutamiento folicular e incluso la formación de quistes. De hecho, es posible inducir la ovulación con inhibidores de la aromatasa de una forma incluso más eficaz que con citrato de clomifeno (Mitwally 2001, Fisher 2002).

Los inhibidores de la aromatasa se utilizaron en el pasado como tratamiento para algunos casos seleccionados de mujeres con cáncer de mama premenopáusico y amenorrea inducida por la quimioterapia. En la mayoría de las mujeres mayores de 40 años esta amenorrea postquimioterapia es permanente. Sin embargo, una minoría de ellas (0-11 %) recuperan la función ovárica durante el tratamiento e incluso pueden quedar embarazadas.

Los estudios que examinaron los niveles de estrógenos en las mujeres premenopáusicas con cáncer de mama tratadas con inhibidores de la aromatasa (Santen 1980, Harris 1982, Wander 1986) mostraron concentraciones elevadas de FSH y LH, lo que indica una inhibición de la síntesis ovárica de estrógenos parcialmente compensada. Los inhibidores de la aromatasa de tercera generación a dosis supratrapéuticas tampoco consiguieron una supresión casi completa como la que se obtiene en las mujeres postmenopáusicas (Wouters 1989, Sterin 1990).

Los resultados obtenidos

Conclusiones

Tras estudiar el desarrollo de adenomas hipofisarios espontáneos y fijar la atención en la hipófisis reproductora y, en particular, en las células hipofisarias productoras de LH de ratones knock out para la aromatasa P450 y compararlas con las de ratones wild type de la misma edad, analizar estadísticamente los resultados obtenidos y contrastarlos con la literatura existente al respecto. Hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1.- El trabajo que se presenta es el primer estudio que constata que la ausencia de aromatasa en roedores de edad avanzada impide o al menos enlentece, de forma significativa, la aparición de adenomas hipofisarios espontáneos, cuya prevalencia es grande cuando persiste la expresión del enzima. Lo que sugiere que la sobre-expresión de la aromatasa P450 en edades avanzadas puede ser una causa principal en la génesis de dichos adenomas.

2.- La imposibilidad de generar estrógenos por ausencia de aromatasa P450 que acontece en los animales knock out provoca un aumento en el porcentaje de células hipofisarias positivas a LH que es prácticamente idéntico en hembras y machos. Lo que sugiere que los estrógenos juegan un importante papel en el mantenimiento de la población gonadotropa hipofisaria no sólo en las hembras sino también en los machos. Este hallazgo es importante ya que demuestra, por primera vez, que el papel de los estrógenos en la regulación inhibitoria de la producción de LH en los machos es más importante que el de los andrógenos y sugiere que los andrógenos podría desarrollar sus efectos reguladores a través de su aromatización a estrógenos en la propia hipófisis, por acción del enzima.

3.- La ausencia de aromatasa P450 induce un aumento del área celular y del área nuclear de las células positivas a LH, afectando también a machos y a hembras, si bien las diferencias en estos parámetros fueron mayores en machos que en hembras, lo que confirma aún más el importante papel regulador de los estrógenos sobre las células gonadotropas en los machos.

4.- Dado que no se hallaron modificaciones en el tamaño global de la hipófisis a pesar del aumento de tamaño y del número de las células gonadotropas, no se puede hablar de hiperplasia hipofisaria inducida por la ausencia de la aromatasa P450. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren la existencia de una hiperplasia de la hipófisis reproductora.

5.- Los cambios observados no afectan por igual a toda la glándula. Claramente en machos y hembras se observó que los cambios afectaban de forma principal a las regiones más laterales de la hipófisis ya fueran dorsales, ventrales o centrales. Lo que sugiere que la respuesta a la regulación estrogénica de las células productoras de LH hipofisarias no es homogénea.

6.- Existen algunas diferencias regionales en la respuesta de las células positivas a LH que dependen del sexo. En los machos las regiones dorsal, polar y central medial responden aumentando el tamaño de las células; mientras que en las hembras, la región dorsal responde aumentando el tamaño celular, y las regiones polar y central medial lo hacen aumentando el número de células. Estos resultados sugieren que la regulación de la población gonadotropa productora de LH está muy influida por los estrógenos, pero que existen otros factores implicados y que éstos podrían ser sexualmente dependientes.

Referencias Bibliográficas

- Amaterius HO (1937). Studies on a neurohypophysial mechanism influencing gonadotropic activity. *Cold Spring Harbor Symp Quart Biol*, 5: 280-288.
- Adams CVM, Svettenhan KV (1958). The histochemical identification of two of basophil cell in the normal human adenohypophysis. *J Pathol Bacteriol*, 75: 95-103.
- Adams JM, Daniel PM, Prichart MML (1964). Distribution anterior lobe of the hypophysial portal blood in the pituitary gland. *Endocrinology*, 75: 120-126.
- Aguilera G, Rabadan-Diehl C, Nikodemova M (2001). Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides*, 22: 769-774.
- Aherne WA, Dunnill MS, Arnold E (1982). Adrenocortical cells in primary culture. *Cell Tissue Res*, 271: 169-176.
- Aherne WA, Camplejohn RS, Wright NA, Arnold E (1977). An introduction to cell population kinetics. London.
- Akingbemi BT (2005). Estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol*, 3: 51.
- Allaerts W, Fluitsma DM, Hoefsmit EI, Jeucken PHM, Morreau H, Bosman FT, Dhage HA (1996). Immunohistochemical, morphological and ultrastructural resemblance between dendritic cells and folliculo-stellate cells in normal human and rat anterior pituitaries. *J Neuroendocrinol*, 8: 17-29.
- Allaerts W, Jeucken PHM, Debets R, Hoefafakker S, Claassen E, Drexhage HA (1997). Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: Implications for interleukin-6 production and accessory function in vitro. *J Neuroendocrinol*, 9: 43-53.
- Amat P, Boya J (1970). Estudio preliminar de la ultraestructura del lóbulo anterior de la hipófisis del cobaya. *An Anat*, 19: 437-454.
- Amsterdam JD, Winokur A, Lucki I, Snyder P, Harris RI, Caroff S, Rickels K (1982). Growth hormone, prolactin and thyrotropin responses to gonadotropin-releasing hormone in depressed patients and healthy volunteers. *Psychoneuroendocrinology*, 7: 177-184.
- Anthony ELP, Gustafson AV (1984). Seasonal variations in pituitary LH-gonadotropes of the hibernating Bat *Myotis Lucifugus Lucifugus*: An Immunohistochemical study. *Amer J Anat*, 170: 101-115.
- Anthony ELP, King SC, Stopa EG (1984). Immunocytochemical localization of LHRH in the median eminence infundibular stalk, and neurohypophysis: Evidence for multiple sites of releasing hormone secretion in humans and other mammals. *Cell Tissue Res*, 336: 5-14.
- Aronin N, Morency K, Leeman SE, Braverman LE, Aronin N (1984). Regulation by thyroid hormone of the concentration of substance P in the rat anterior pituitary. *Endocrinology*, 114: 21-38.
- Asa SL (1998). Tumors of the pituitary gland. Atlas of tumor pathology, Third series Fascicle 22. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC.
- Asa SL, Ezzat S (2002). The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer*, 2: 836-849.
- Asa SL, Ezzat V (1998). The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev*, 19: 798-827.
- Asa SL, Kovacs K, Bilbao JM (1983). The pars tuberalis of the human pituitary: a histologic, immunohistochemical, ultrastructural and immunoelectron microscopy analysis. *Virchows Archiv (Pathol Anat)*, 399: 49-59.
- Asa SL, Kovacs K, Melmed S (1995). The hypothalamic-pituitary axis. En: Melmed S (ed). The pituitary. Blackwell Science Inc, pp 3-44.

- Asa SL, Penz G, Kovacs K, Serrín C (1982). Prolactin cells in the human pituitary: a quantitative immunocytochemical analysis. *Arch Pathol Lab Med*, 106: 360-363.
- Aumüller G, Wagner R, Gräf KJ (1978). Fine structure of rat prolactin cells after treatment with a long acting depot contraceptive. *Acta Endocrinol*, 89: 251-262.
- Baertschi AJ (1980). Portal vascular route from hypophysial stalk/neural lobe to adenohypophysis. *Am J Physiol*, 239: 463-469.
- Baes M, Allaerts W, Denef C (1987). Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary aggregates. *Endocrinology*, 120: 685-691.
- Bailey P, Davidoff LM (1925). Concerning the microscopic structure of the hypophysis cerebri in acromegaly. *Amer J Pathol*, 1: 185-207.
- Bain J, Ezrin C (1970). Immunofluorescent localization of the LH cell of human adenohypophysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 30: 181-184.
- Baker BL, Gross DS (1978). Cytology and distribution of secretory cell types in the mouse hypophysis as demonstrated with immunocytochemistry. *Am J Anat*, 153: 193-216.
- Baker BL (1977). Cellular composition of the human pituitary pars tuberalis as revealed by immunocytochemistry. *Cell Tissue Res*, 182: 151-163.
- Baker BL, Yu YY (1975). Immunocytochemical analysis of cells in the pars tuberalis of the rat hypophysis with antisera to hormones of the pars distalis. *Cell Tissue Res*, 156: 443-449.
- Baker BL, Pierce JG, Coriell (1972). The utility of antiserums to subunits of TBH and LH for immunohistochemical staining of the rat hypophysis. *Am J Anat*, 135: 251-268.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J (2002). Sexual partner preference requires a functional aromatase (Cyp19) gene in male mice. *Hormon Behavior*, 42: 158-171.
- Balthazart J, Foidart A (1993). Brain aromatase and the control of male sexual behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 44: 521-540.
- Balthazart J, Baillien M, Ball GF (2006a). Rapid control of brain aromatase activity by glutamatergic inputs. *Endocrinology*, 147: 359-366.
- Balthazart J, Ball GF (2006b). Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci*, 29: 241-249.
- Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar NJ (1987). Proliferative index breast carcinoma determined in situ by KI 67 immunostaining and its relationship to pathological and clinical variables. *J Pathol*, 152: 287-295.
- Barnett RJ, Ladmai AJ, McCallister NJ, Siperbtein ER (1956). The localization of glycoprotein hormones in the anterior pituitary glands of rats investigated by differential protein solubilities, histological stains and bio-assays. *Endocrinology*, 59: 398-411.
- Batten T, Ball JN, Benjamin M (1975). Ultrastructure of the adenohypophysis in the teleost *Poecilia latipinna*. *Cell Tissue Res*, 161: 239-261.
- Begeot M, Hemming FJ, Dubois MP, Dubois PM (1983). Gonadotropin releasing hormone (GnRH) stimulates immunoreactive lactotrope differentiation. *Endocrinology*, 112: 2224-2226.
- Begeot M, Morel G, Rivest RW, Dubois PM (1984b). Influence of gonadoliberein of the differentiation of rat gonadotrophs: an in vivo and in vitro study. *Neuroendocrinology*, 38: 217-225.

- Behringer RR, Mathews LS, Palmiter RD, Brinster RL (1988). Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells. *Genes Dev*, 2: 453-461.
- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E (1978). Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 202: 631-633.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*, 22: 724-763.
- Benlot C, Pagesy P, Peillon F, Joubert-Bression D (1991). Growth hormone releasing hormone and somatostatin in normal and tumoral pituitaries. *Peptides*, 12: 945-950.
- Besson J, Rotsztejn W, Laburthe M, Epelbau, J, Beaudet A, Kordon C, Rosselin G (1979). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP): brain distribution, subcellular localization and effect of deafferentation of the hypothalamus in male rats. *Brain Res*, 165: 79-85.
- Bethea CL, Brown NA, Kohama SG (1996). Steroid regulation of estrogen and progesterin receptor messenger ribonucleic acid in monkey hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, 137: 4372-4383.
- Bettio D, Rizzi N, Giardino D, Persani L, Pecori-Giraldi F, Losa M, et al. (1997). Cytogenetic study of pituitary adenomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 98: 131-136.
- Bevan JS (2008). Functional assesment of the pituitary. En: *Clinical endocrine oncology*. Hay ID, Wass JAH (eds). Blackwell publishing, Oxford. pp 194-199.
- Bhasin S, Fielder TJ, Swerdloff RS (1987). Testosterone selectively increases serum follicle-stimulating hormone (FSH) but not luteinizing hormone (LH) in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated male rats: Evidence for differential regulation of LH and FSH secretion. *Biol Reprod*, 37: 55-59.
- Bianco SD, Kaiser UB (2009). The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol*, 5: 569-576.
- Blaschke W (1949). *Vorlesungen über Integralgeometrie*. Chelsea Publishing Company.
- Blaustein JD (2010). The year in neuroendocrinology. *Mol Endocrinol*, 24: 252-260.
- Bonnesen T, Fenchel W (1934). *Theorie der konvexen Körper. Ergebnisse der Mathematik und ihrer Grenzgebiete* 3, S. 1.
- Boyar RM, Perlow M, Kapen S, Lefkowitz G, Weitzman E, Hellman L (1973). The effect of clomiphene citrate on the 24-hour LH secretory pattern in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 36: 561-567.
- Brada M, Ford D, Ashley S, Bliss JM, Crowley S, Mason M, Rajan B, Traish D (1992). Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *Br Med J*, 304: 1343-1346
- Brioude F, Bouligand J, Trabado S, Francou B, Salenave S, Kamenicky P (2010). Non-syndromic congenital hypogonadotropic hypogonadism: Clinical presentation and genotype phenotype relationships. *Eur J Endocrinol*, 162: 835-851.
- Britt KL, Drummond AE, Cox VA, Dyson M, Wreford NG, Jones ME, Simpson ER, Findlay JK (2000). An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology*, 14: 2614-2623.
- Bruhn TO, Rondeel JMM, Bolduc TG, Jackson IMD (1995). Thyrotropin-releasing hormone gene expression in cultured anterior pituitary cells: role of gender. *Neuroendocrinology*, 61: 77-84.

- Bryant MG, Bloom SR, Polak JM, Alburquerque RH, Moldin J, Pearse AGE (1976). Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. *Lancet*, 991-993.
- Buffa R, Solcia E, Fiocca R, Crivelli O, Pera A (1979). Complement-mediated binding of immunoglobulins to some endocrine cells of the pancreas and gut. *J Histochem Cytochem*, 27: 1279-1280.
- Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Simpson ER (1999). Aromatase as a therapeutic target in endometriosis. *Trends Endocrinol Metab*, 11: 22-27.
- Burns KH, Matzuk MM (2002). Minireview: Genetic models for the study of gonadotropin actions. *Endocrinology*, 143: 2823-2835.
- Butler JA, Sjöberg M, Coen CW (1999). Evidence for oestrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *J Neuroendocrinol*, 11: 331-335.
- Cameron L (1997). Stress and behaviorally induced reproductive dysfunction in primates. *Semin Reprod Endocrinol*, 15: 37-45.
- Cantalamesa L, Reschini E, Catania A, Giustina G (1976). Pituitary hormone responses to hypothalamic releasing hormones in acromegaly. *Acta Endocrinol*, 83: 673-683.
- Capela C, Hage E, Solcia E, Usellini L (1978). Ultrastructural similarity of endocrine-like cells of the human lung and some related cells of the gut. *Cell Tissue Res*, 186: 25-37.
- Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER (1997). Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med*, 337: 91-95.
- Carbajo E, Carbajo S, Carretero J, Vazquez R (1987). Análisis morfológico de la acción de dosis altas y repetidas de hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) sobre las células LH hipofisarias. *Anales de Anatomía*, XXXIII: 1-12.
- Carol W, Lauterbach H, Klinger G, Unger A, Michels W (1988). Prolactin stimulation using the metoclopramide test in females taking oral contraceptives. *Zentralbl Gynakol*, 110: 1515-1521.
- Carrascal E (1983). Láminas de Histología. III. Organografía microscópica. Universidad de Salamanca, pp 14-17.
- Carreau S (2001). Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. *Mol Cell Endocrinol*, 178: 65-72.
- Carretero J (1984). La administración intraventricular de met-enkefalina y su repercusión sobre las células de prolactina. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Carretero J, Sanchez F, Blanco E, Riesco JM, Vazquez R (1988). Analysis of immunoreactive PRL-cells following treatment with met-enkephalin. *Z Mikrosk Anat Forsch*, 102: 711-720.
- Carretero J, Sánchez F, Torres JL, Blanco E, Riesco JM, Vázquez R (1989). Study of h-TSH immunoreactive adenohypophyseal cells following treatment with methy-mazole. *Histol Histopathol*, 4: 71-76.
- Carretero J, Sánchez F, Montero M, Blanco E, Riesco JM, Carbajo E, González R, Vázquez R (1990). Morphological and functional study of the GH-immunoreactive adenohypophyseal cells in ovariectomized rats. *Histochem J*, 22: 683-687.

- Carretero J, Sanchez F, Montero M, Gonzalez R, Blanco E, Riesco JM, Vazquez R (1991a). Morphometric study of the LH-immunoreactive gonadotrophic cells of rats following treatment with methoclopramide. *Histol Histopathol*, 6: 101-105.
- Carretero J, Sánchez F, Vázquez R, Cacicedo L, Sánchez-Franco F, Fernández G, Montero M (1991b). In vivo and in vitro evidence of growth hormone-releasing factor-like produced locally in the adenohypophyseal cells of the rat. *Neuropeptides*, 19: 223-229.
- Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Cabo JJ, Riesco JM, Angoso M, Vázquez R (1992a). Immunocytochemical and morphometric study of the PRL-cell following chronic administration of TRH and methimazole. *An Anat*, 38: 183-189.
- Carretero J, Sánchez F, Rubio M, Lorenzo MJ, Francos M, Cacicedo L, Sánchez-Franco F, Vázquez R (1992b). Immunocytochemical evidence of hypothalamic regulation of adenohypophyseal VIP in the male rat. *Neuropeptides*, 23: 239-243.
- Carretero J, Rubio M, Navarro N, Nieto P, Vázquez RJ, Sánchez F, Vázquez R (1995a). In vitro modifications in the proliferation rate of prolactin cells are accompanied by nuclear morphometric variations. *Histol Histopathol*, 10: 135-139.
- Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Vázquez RJ, Santos M, Blanco E, Vázquez R (1995b). In vitro morphometric and proliferative variations in VIP-immunoreactive pituitary cells induced by estradiol. *Neuroendocrinology*, 62: 277-282.
- Carretero J, Vázquez RJ, Santos M, Cacicedo L, Rubio M, Sánchez-Franco F, Vázquez R (1996). Dopamine inhibits in vitro release of VIP and proliferation of VIP-immunoreactive pituitary cells. *Neuropeptides*, 30: 81-86.
- Carretero J, Rubio M, Vázquez-Perfecto RJ, Sánchez F, Torres JL, Pérez RM, Vázquez R (1997a). Decreases in the size and proliferation rate of VIP-immunoreactive cells induced in vitro by testosterone are associated with decreases in VIP release. *Neuroendocrinology*, 65: 173-178.
- Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Estévez MJ, Santos M, Vázquez G, Blanco E, Vázquez R (1997b). Hyperactivity and proliferation of prolactin cells induced in vitro by met-enkephalin. *Eur J Anat*, 1: 89-95.
- Carretero J, Vázquez RJ, Sánchez F, Rubio M, Santos M, Vázquez G, Martín-Clavijo A, Vázquez R (1998). Inverse effects of estradiol and testosterone on the in vitro proliferation rate of rat VIP-immunoreactive pituitary cells. *Eur J Anat*, 2: 101-108.
- Carretero J, Blanco E, Vázquez G, Rubio M, Santos M, Pérez RM, Vázquez R (1999a). Immunohistochemical evidence for the expression of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Cell Tissue Res*, 295:419-423.
- Carretero J, Vázquez G, Martín-Clavijo A, Rubio M, Hernández E, Moro JA, Gato A, Barbosa E, Vázquez R (1999b). In vivo studies on cytodifferentiation of pituitary aromatase-immunoreactive cells. *Eur J Anat*, 3: 79-85.
- Carretero J, Burks DJ, Vázquez G, Rubio M, Hernández E, Bodego P, Vázquez R (2002). Expression of aromatase P450 is increased in spontaneous prolactinomas of aged rats. *Pituitary*, 5: 5-10.
- Carretero J, Vázquez G, Rubio M, Blanco E, Juanes JA, Pérez E, Burks D, Vázquez R (2003). Postnatal differentiation of the immunohistochemical expression of aromatase P450 in the rat pituitary gland. *Histol Histopathol*, 18: 419-423.
- Carretero J, Hernández R, Tapia M, Prieto D, Carretero M, Gutiérrez S, González R, Basco M, González L, Herrero JJ, Rubio M, Blanco E, Vázquez R (2009). Immunocytochemical evidence for the coexistence of aromatase P450 and estrogen receptor α in the pituitary gland of the adult male rat. *Eur J Anat*, 13: 1-6.

- Carretero J, Blanco E, Rubio M, Riesco JM, García-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Carretero-Hernández M, Herrero JJ, Burks DJ (2011). Gonadal steroids regulate aromatase P450 expression in the rat pituitary. *Eur J Anat*, 15: 98-106.
- Casanueva FF, Dieguez C (1999). Growth hormone secretagogues: Physiological role and clinical utility. *Trends Endocrinol Metab*, 10: 30-38.
- Casanueva FF, Villanueva L, Cabranes JA, Cabezas-Cerrato J, Fernandez-Cruz A (1984). Cholinergic mediation of growth hormone secretion elicited by arginine, clonidine, and physical exercise in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 59: 526-530.
- Catchpole HR (1949). Distribution of glycoprotein hormones in the anterior pituitary gland of the rat. *J Endocrinology*, 6: 218-224.
- Charles MA, Suh H, Drouin J, Camper SA, Gage PJ (2005). PITX genes are required for cell survival and Lhx3 activation. *Mol Endocrinol*, 19: 1893-1903.
- Chateau M, Marchetti J, Burlet A, Boulange M (1979). Evidence of vasopressin in adenohypophysis: research into its role in corticotrope activity. *Neuroendocrinol*, 28: 25-35.
- Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE, Seeburg PH (1989). The human growth hormone locus: Nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics*, 4: 479-497.
- Childs GV, Ellison DG, Unabia G (1990). Functional differentiation of gonadotropes and thyrotropes. Glycoprotein hormones. Chin WW, Boime I (eds). *Serono Symposia, USA*, pp 1-10.
- Childs GV, Unabia G, Komak S (2001). Differential expression of estradiol receptors alpha and beta by gonadotropes during the estrous cycle. *J Histochem Cytochem*, 49: 665-666.
- Christian CA, Moenter SM (2010). The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocrine Rev*, 31: 544-577.
- Clarke I, Jessop D, Millar R, Morris M, Bloom S, Lightman S (1993). Many peptides that are present in the external zone of the median eminence are not secreted into the hypophysial portal blood of sheep. *Neuroendocrinology*, 57: 765-775.
- Clayton RN, Farrell WE (2004). Pituitary tumour clonality revisited. *Front Horm Res*, 32: 186-204.
- Clements JA, Reyes FI, Winter JS, Faiman C (1980). Ontogenesis of gonadotropin-releasing hormone in the human fetal hypothalamus. *Proc Soc Exp Biol Med*, 163: 437-444.
- Cocchia D, Miani N (1980). Immunohistochemical localization of the brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *J Neurocytol*, 9: 771-782.
- Cordido F, Casanueva F, Vidal O, Diéguez C (1994). Physiopathology of hypophyseal tumors secreting growth hormone, prolactin and glycoproteins. *An Med Interna*, 11: 89-94.
- Cornil CA, Ball GF, Balthazart J (2006). Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? *Brain Res*, 1126: 2-26.
- Costoff A (1973). *Ultrastructure of rat adenohypophysis. Correlation with function.* New York-London, Academic Press.
- Couse JF, Yates MM, Walker VR, Korach KS (2003). Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ER-beta. *Mol Endocrinol*, 17: 1039-1053.

- Crofton MW (1877). Geometrical theorems related to mean values. *Proc Lond Math Soc*, 8: 304.
- Crowley WF, McArthur JW (1980). Simulation of the normal menstrual cycle in Kallman's syndrome by pulsatile administration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH). *J Clin Endocrinol Metab*, 51: 173-175.
- Cushing H (1912). *The pituitary body and its disorders: Clinical states produced by disorders of the hypophysis cerebri*. Philadelphia & London, J.B. Lippincott.
- Dada DA, Blake MJ, Stein EA (1984). Pars distalis cell quantification in normal adult male and female rats. *J Endocr* 101: 87-94.
- Dallman MF (2005). Fast glucocorticoid actions on brain: Back to the future. *Front Neuroendocrinol*, 26: 103-108.
- Davis JR, Sheppard MC, Shakespear RA, Lynch SS, Clayton RN (1986). Does growth hormone releasing factor desensitize the somatotroph? Interpretation of responses of growth hormone during and after 10-hour infusion of GRF 1-29 amide in man. *Clin Endocrinol*, 24: 135-140.
- De Marinis L, Manzini A, Zuppi P, Anile C, Maira G (1990). Paradoxical growth hormone response to thyrotropin-releasing hormone in acromegaly. Clinical correlations and prognostic value. *Acta Endocrinol*, 122: 443-449.
- De Nicola AF, von Lawzewitsch I, Kaplan SE, Libertun C (1978). Biochemical and ultrastructural studies on estrogen-induced pituitary tumors in F344 rats. *J Natl Cancer Inst*, 61: 753-763.
- De Palatis LR, Fiorindo RP, Ho RH (1982). Substance P immunoreactivity in the anterior pituitary gland of the guinea pig. *Endocrinology*, 110: 282.
- De Souza EB, Perrin MH, Whitehouse PJ, Rivier J, Vale W, Kuhar M (1985). Corticotropin-releasing factor receptors in human pituitary gland: autoradiographic localization. *Neuroendocrinology*, 40: 419-422.
- Del Valle J, Gómez AL (2000). Disgenesias gonadales. *Gónadas Actualizaciones en Endocrinología*. McGraw-Hill Interamericana. Capítulo 6.
- Delesse A (1847). Procède mécanique pour déterminer la composition des roches (extrait). *C R Acad Sci Paris*, 25: 544.
- Delthiel R (1926). *Probabilités géométriques*. Gauthier-Villars et Ge. Eds Ecole Polytechnique Paris.
- Demay F, De Monti M, Tiffocche C, Vaillant C, Thieulant ML (2001). Steroid independent activation of ER by GnRH in gonadotrope pituitary cells. *Endocrinology*, 142: 3340-3347.
- Denef C, Hautekeete E, De Wolf A, Vaiderschuerei B (1978). Pituitary basophils from immature male and female rats. Distribution of gonadotrophs and thyrotrophs as studied by unit gravity sedimentation. *Endocrinology*, 103: 724-735.
- Deschepper ChF, Seidler ChO, Steele MK, Ganong EF (1985). Further studies on the localization of angiotensin-II-like immunoreactivity in the anterior pituitary gland of the male rat, comparing various antisera to pituitary hormones and their specificity. *Neuroendocrinology*, 40: 471-475.
- Dev PK, Srivastava PM (1975). Tinctorial behavior of the cell types in the adenohypophysis of swiss albino mice. *Acta Anat*, 92: 178-193.
- Dexlex P, Ross GL, Probst D (1976). Ultrastructural study of the adenohypophysis of the chinese hamster. *Acta Anat*, 96: 35-54.

- Donangelo I, Melmed S (2008). Molecular pathogenesis of pituitary adenomas. En: Clinical endocrine oncology. Hay ID, Wass JAH (eds). Blackwell publishing, Oxford, pp 187-193.
- Dong KE, Yu KL, Roberts JL (1993). Identification of a major up-stream transcription start site for the human gonadotropin-releasing hormone gene used in reproductive tissues and cell lines. *Mol Endocrinol*, 7: 1654-1666.
- Doniach I (1985). Histopathology of the pituitary. *Clin Endocrinol Metab*, 14: 765-789.
- Drummond AE, Baillie AJ, Findlay JK (1999). Ovarian estrogen receptor α and β mRNA expression: impact of development and estrogen. *Mol Cell Endocrinol*, 149: 153-161.
- Dukes M, Edwards PN, Large M, Smith IK, Boyle T (1996). The preclinical pharmacology of "Arimidex" (Anastrozole; ZD1033) - a potent, selective aromatase inhibitor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 58: 439-445.
- Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA (2006). Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 147: 1154-1158.
- Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA (2006). Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 147: 1154-1158.
- Elias H, Hyde DM (1980). An elementary introduction to stereology quantitative microscopy. *Am J Anat*, 159: 412-446.
- Elias PM, Ornstein L, Lutzner MA, Robbins JH (1971). A method for studying the ultrastructure of intercellular contacts in leukocyte cultures. *Experientia*, 27: 116-118.
- Ellis MJ, Schmidli RS, Donald RA, Livesey JH, Espiner EA (1990). Plasma corticotrophin-releasing factor and vasopressin responses to hypoglycaemia in normal man. *Clin Endocrinol*, 32: 93-100.
- Fahrenkrug J, Schaffalitzky DE, Muckadell OB (1978). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human cerebrospinal fluid. *Brain Res*, 124: 581-586.
- Farid NR, Szkudlinski MW (2004). Minireview: Structural and functional evolution of the thyrotropin receptor. *Endocrinology*, 145: 4048-4057.
- Farquhar MG (1971). Processing of secretory products by cells of the anterior pituitary gland. *Mem Soc Endocrinol*, 19: 79-124.
- Farquhar MG, Rinehart JF (1954). Electron microscopic of the anterior pituitary gland of castrate rats. *Endocrinology*, 54: 516-541.
- Farquhar MG, Skutelsky EH, Hopkins CR (1975). Structure and function of the anterior pituitary and dispersed pituitary cells, in vitro studies. In: The anterior pituitary gland. Tixier-Vidal A, Farquhar MG (eds). New York, Academic Press, pp 83-135.
- Fellmann D, Bresson JL, Clavequi MC, Bugnon C (1982). Quantitative immunocytochemical studies on the gonadotrophs isolated from the pituitary of the male rat. *Cell Tissue Res*, 224: 137-144.
- Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G, Mitchel R, Gospodarowicz D (1987). Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 5773-5777.
- Ferris HA, Shupnik MA (2006). Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GnRH1. *Biol Reprod*, 74: 993-998.

- Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF Jr (1986). Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 62: 1136-1144.
- Finelli P, Giardino D, Rizzi N, Buiatitot S, Virduci T, Franzin A, et al. (2000). Non-random trisomies of chromosomes 5, 8 and 12 in the prolactinoma sub-type of pituitary adenomas: Conventional cytogenetics and interphase FISH study. *Int J Cancer*, 86: 344-350.
- Finelli P, Pierantoni GM, Giardino D, Losa M, Rodeschini O, Fedele M, et al. (2002). The high mobility group A2 gene is amplified and overexpressed in human prolactinomas. *Cancer Res*, 62: 2398-2405.
- Finkelstein JS, O'Dea LS, Whitcomb RW, Crowley WF Jr (1991). Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. II. Effects of estradiol administration in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. *J Clin Endocrinol Metab*, 73: 621-628.
- Fischer UG, Wood SH, Bruhn J, Roseff SJ, Mortola J, Rivier JE, Ven SS (1992). Effect of human corticotropin-releasing hormone on gonadotropin secretion in cycling and postmenopausal women. *Fertil Steril*, 58: 1108-1112.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER (1998). Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *PNAS*, 95: 6965-6970.
- Fisher SA, Reid RL, Van Vugt DA (2002). A randomized double-blind comparison of clomiphene citrate and the aromatase inhibitor letrozole on ovulatory function in normal women. *Fertil Steril*, 78: 280-285.
- Forssmann WG, Pickel V, Reinecke M, Hock D, Metz J, Heym C, Forssmann WG (1981). Immunohistochemistry and immunocytochemistry of nervous tissue. En: *Techniques in Neuroanatomical research*. Springer-Verlag, Berlin, pp 171-205.
- Friedgood MB (1937). The nervous control of the anterior hypophysis (originally presented at the Harvard Tercentenary Celebration, September 15, 1936). *J Reprod Fertility*, Suppl 10: 3-14.
- Fusco A, Fedele M (2007). Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, 7: 899-910.
- Gaillard RC, Riondel AM, Ling N, Muller AF (1988). Corticotropin releasing factor activity of CRF 41 in normal man is potentiated by angiotensin II and vasopressin but not by desmopressin. *Life Sci*, 43: 1935-1944.
- Galmiche G, Richard N, Corvaisier S, Kottler ML (2006a). The expression of aromatase in gonadotropes is regulated by estradiol and gonadotropin-releasing hormone in a manner that differs from the regulation of luteinizing hormone. *Endocrinology*, 147: 4234-4244.
- Galmiche G, Corvaisier S, Kottler ML (2006b). Aromatase gene expression and regulation in the female rat pituitary. *Ann N Y Acad Sci*, 1070: 286-292.
- García CF, Weiss LM, Lowder J (1987). Quantitation and stimulation of lymphocyte subsets in tissue sections. Comparison with flow cytometry. *Am J Pathol*, 87: 470-477.
- Garcia MM, Kapcala LP (1995). Growth of a microprolactinoma to a macroprolactinoma during estrogen therapy. *J Endocrinol Invest*, 18: 450-455.
- García RL, Coltrera MD, Gown AM (1989). Analysis of proliferative grade using anti PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol*, 134: 733-739.

- García Barrado MJ, Blanco EJ, Carretero-Hernández M, Iglesias-Osma MC, Carretero M, Herrero JJ, Burks DJ, Carretero J (2014). Local transformations of androgens into estradiol by aromatase p450 is involved in the regulation of prolactin and the proliferation of pituitary prolactin-positive cells. *PLoS One* 30; 9: e101403. doi: 10.1371/journal.pone.0101403.
- Gatter KC, Dunnill MA, Gerdes J, Stein H, Mason DY (1986). New approach to assessing lung tumours in man. *J Clin Pathol*, 39: 590-593.
- Gerall AA, Moltz H, Ward IL (1992). Handbook of behavioral neurobiology. Volume 11: Sexual differentiation. pp 363.
- Gevers EF, Loveridge N, Robinson IC (2002). Bone marrow adipocytes: A neglected target tissue for growth hormone. *Endocrinology*, 143: 4065-4073.
- Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev*, 11: 177-199.
- Giannattasio G, Zanini A, Meldolesi J (1975). Molecular organization of rat prolactin granules. In vitro stability of intact and membraneless granules. *J Cell Biol*, 64: 246-251.
- Gil J (1992). Estudio inmunocitoquímico de las estirpes celulares productoras de neuropéptidos: péptido intestinal vasoactivo (VIP), hormona liberadora de GH (GRF) y somatostatina (SRIF), en la hipófisis de la rata. Tesis Doctoral.
- Giometto B, Miotto O, Botteri M, Alessio L, Scanarini M, An SF, Tavolato B (1997). Folliculo-stellate cells of human pituitary adenomas: immunohistochemical study of the Monocyte/Macrophage phenotype expression. *Neuroendocrinology*, 65: 47-52.
- Girod C (1984). Fine structure of the pituitary pars distalis. En: Motta PM (ed). Ultrastructure of endocrine cells and tissues. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, pp 12-28.
- Girod C, Trouillas J, Dubois MP (1985). Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the anterior lobe of the normal human pituitary. *Cell Tissue Res*, 241: 505-511.
- Girod C, Dubois MP, Trouillas J (1980). Mise en évidence des cellules gonadotropes de l'adénohypophyse (pars distalis et tuberalis) du Singe macacus Iris. Etude immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-FSH humaine et anti-LH ovine. *C R Soc Biol Paris*, 174: 304-313.
- Girod C, Dubois MP, Trouillas J (1981). Immunohistochemical localization of FSH and LH in the pars distalis of vervet (*Cercopithecus aethiops*) and Baboon (*Papio hamadryas*). *Cell Tissue Res*, 217: 245-259.
- Glidewell-Kenney C, Hurley LA, Pfaff L, Weiss J, Levine JE, Jameson JL (2007). Non-classical estrogen receptor alpha signalling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. *Proc Nat Acad Sci USA*, 104: 8173-8177.
- Golick ML, Rice M (1992). Optimum staining of PCNA in paraffin sections is dependent of fixation, drying and intensification. *J Histotechnol*, 15: 39-41.
- Golovine K, Schwerin M, Vanselow J (2003). Three different promoters control expression of the aromatase cytochrome p450 gene (cyp19) in mouse gonads and brain. *Biol Reprod*, 68: 978-984.
- Gon G, Giaid A, Steel JH, O'Halloran DJ, Van Noorden S, Ghatei MA, Jones PM, Amara SG, Ishikawa H, Bloom SR, Polak JM (1990). Localization of immunoreactivity for calcitonin gene-related peptide in the rat anterior pituitary during ontogeny and gonadal steroid manipulations and detection of its messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*, 127: 2618-2629.

- Gooren LJ, Assies J, Asscheman H, de Slegte R, van Kessel H (1988). Estrogen induced prolactinoma in a man. *J Clin Endocrinol Metab*, 66: 444-446.
- Gormley GJ (1992). Chemoprevention strategies for prostate cancer: The role of 5 alpha-reductase inhibitors. *J Cell Biochem, Suppl* 16: 113-117.
- Goto-Kazeto R, Kight KE, Zohar Y, Place AR, Trant JM (2004). Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*, 139: 72-84.
- Gracia-Navarro F, Doerr-Schott (1982). Immunohistochemical detection of adenohypophyseal cells containing hormones in rana ridibunda. *Cell Tissue Res*, 222: 687-690.
- Grafer CM, Thomas R, Lambrakos L, Montoya I, White S, Halvorson LM (2009). GnRH stimulates expression of PACAP in the pituitary gonadotropes via both the PKA and PKC signaling systems. *Mol Endocrinol*, 23: 1022-1032.
- Grattan DR, Kokay IC (2008). Prolactin: A pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol*, 20: 752-763.
- Green JD, Harris GV (1947). The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. *J Endocrinol*, 5: 136-146.
- Guyer MF, Claus EG (1937). Vacuolation of the anterior pituitary gland following castration, implantation of cancer tissue and thyroidectomy. *Anat Rec*, 67: 145-153.
- Haissenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA (1991). A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: Evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology*, 128: 509-517.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillet CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, 162: 285-294.
- Halmi NS, Parsons JA, Erlandsen SL, Duello T (1975). Prolactin and growth hormone cells in the human hypophysis: A study with immunoenzyme histochemistry and differential staining. *Cell Tissue Res*, 158: 497-507.
- Halmi NS (1950). Two types of basophils pituitary of the rat and their respective significance. *Endocrinology*, 47: 289-299.
- Halmi NS (1952). Two types of basophils in the rat pituitary: "tirotrophs and Gonadotrophs" vs beta and delta cells. *Endocrinology*, 50: 140-142.
- Harada N, Utsumi T, Takagi Y (1993). Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 11312-11316.
- Harada N, Yamada K (1992). Ontogeny of aromatase messenger ribonucleic acid in mouse brain: fluorometrical quantitation by polymerase chain reaction. *Endocrinology*, 131: 2306-2312.
- Harris AL, Dowsett M, Jeffcoate SL, McKinna JA, Morgan M, Smith IE (1982). Endocrine and therapeutic effects of aminoglutethimide in premenopausal patients with breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 55: 718-722.
- Harris GV (1937). The induction of ovulation in the rabbit by electrical stimulation of the hypothalamohypophysial mechanism. *Proc Roy Soc London ser B*, 122: 374-394.

- Hayes FJ, Seminara SB, DeCruz S, Boepple PA, Crowley WF (2000). Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 3027-3035.
- Hedinger CE, Farquhar MG (1957). Elektronen mikroskopische Untersuchungen von zwei typen acidophiler Hypophysenvorderlappen zellen bei der Ratte. *Schweiz Z allg Pathol Bakteriol*, 20: 766-768.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews*, 87: 905-931.
- Herbert DC (1980). Morphology of the mamotrophs and gonadotrophs in the anterior pituitary gland of rats with protein-calorie malnutrition. *Amer J Anat*, 158: 521-531.
- Herbert DC, Schupples J, Poggel A, Gunzel P, El Etreby MF (1977). Effect of cyproterone acetate on prolactin secretion in the female Rhesus Monkey. *Cell Tissue Res*, 183: 51-60.
- Herbert DC (1978). Identification of the LH and TSH-secreting cells in the pituitary gland of the Rhesus Monkey. *Cell Tissue Res*, 190: 151-161.
- Herbert DC (1975). Localization of Antisera to LH β and FSH β in the rat pituitary gland. *Am J Anat*, 144: 379-385.
- Herbert DC (1976). Immunocytochemical evidence that luteinizing hormone LH and follicle stimulating hormone (FSH) are present in the same cell type in the Rhesus monkey pituitary gland. *Endocrinology*, 98: 1554-1557.
- Herbison AE, Robinson JE, Skinner DC (1993). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology*, 57: 751-759.
- Herbison AE (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin releasing hormone neurons. *Endocr Rev*, 19: 302-330.
- Herbison AE, Neill JD (2006). Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. *Knobil and Neill's: Physiology of reproduction*, 3: 1415-1482.
- Herlant M (1960). Etude critique de deux techniques nouvelles destinées a mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentes dans la glande pituitaire. *Bull Micr Appl*, 10: 37-44.
- Herlant M (1964). The cells of the adenohypophysis and their functional significance. (Bourne GH, Danielli JF, eds.). *Int Rev Cytol*, 17: 299-382. Academic Press, New York.
- Hickey GJ, Krasnow JS, Beattie WG, Richards JS (1990). Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinisation: Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genotic DNA. *Mol Endocrinol*, 4: 3-12.
- Hinsey JC (1937). The relation of the nervous system to ovulation and of the phenomena of the female reproductive tract. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 5: 269-279.
- Hofler H, Walter GF, Denk H (1984). Immunohistochemistry of folliculo-stellate cells in normal human adenohypophyses and in pituitary adenomas. *Acta Neuropathol*, 65: 35-40.
- Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes

- P450, 17 α and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 865-870.
- Holmes RL (1963). Gonadotrophic and tirotrophic cells of the pituitary gland of the ferret. *J Endocrinol*, 111: 1421-1423.
- Honda S, Harada N, Takagi Y (1994). Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 198: 1153-1160.
- Honda SI, Harada N, Takagi Y (1996). The alternative exons 1 of the mouse aromatase cytochrome P-450 gene. *Biochim Biophys Acta*, 1305: 145-150.
- Hopkins CR, Farquhar MG (1973). Hormone secretion by cells dissociated from rat anterior pituitaries. *J Cell Biol*, 59: 276-303.
- Horvath E, Kovacs K (1988). Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and human. *J Electr Microsc Tech*, 8: 401-432.
- Horvath E, Kovacs K (2008). Pathology of tumors of the pituitary. En: *Clinical endocrine oncology*. Hay ID, Wass JAH, eds. Blackwell Publishing.
- Horvath E, Use G, Kovacs K (1977). Enigmatic bodies in human corticotroph cells. *Acta Anat*, 98: 427-433.
- Hotchkiss RD (1948). A microchemical reaction resulting in the staining of the polysaccharides structures in fixed tissue preparations. *Arch Biochem*, 16: 131-141.
- Hrabovszky E, Steinhauser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I (2001). Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*, 142: 3261-3264.
- Hrabovszky E, Kallo I, Szlavik N, Keller E, Merchenthaler I, Liposits Z (2007). Gonadotropin releasing hormone neurons express estrogen receptor-beta. *J Clin Endocr Metab*, 92: 2827-2830.
- Hutson JC, Childs GV, Gardner PJ (1979). Considerations for establishing the validity of immunocytochemical studies. *J Histochem Cytochem*, 27: 1201-1202.
- Ishibashi M, Yamaji T (1985). Mechanism of the inhibitory action of dopamine and somatostatin on prolactin secretion from human lactotrophs in culture. *J Clin Endocrinol Metab*, 60: 599-606.
- Ivanova T, Beyer C (2000). Ontogenetic expression and sex differences of aromatase and estrogen receptor-alpha/beta mRNA in the mouse hippocampus. *Cell Tissue Res*, 300: 231-237.
- Jacobs LS, Snyder PJ, Wilber JF, Utiger RD, Daughaday WH (1971). Increased serum prolactin after administration of synthetic thyrotropin releasing hormone (TRH) in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 33: 996-998.
- Jansen BG (1982). Distribution and number of gonadotrophic cells in the pituitary gland of prepubertal female rats. *J Endocrinol*, 94: 381-388.
- Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Janssen S, Osawa Y, Bnick D (1998). Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active p450 aromatase. *J Androl*, 19: 65-71.
- Jenkins C, Michael D, Mahendroo M, Simpson E (1993). Exon-specific northern analysis and rapid amplification of cDNA ends (RACE) reveal that the proximal promoter II (PII) is responsible for aromatase cytochrome P450 (CYP19) expression in human ovary. *Mol Cell Endocrinol*, 97: 1-6.
- Jenks BG (2009). Regulation of proopiomelanocortin gene expression: An overview of the signaling cascades, transcription factors and responsive elements involved. *Ann NY Acad Sci*, 1163: 17-30.

- Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER (2000). Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 12735-12740.
- Joubert O, Benlot C, Lagoguey A, Garnier P, Brandi AM, Gautron JP, Peillon F (1989). Normal and growth hormone (GH)-secreting adenomatous human pituitaries release somatostatin and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 68: 572-577.
- Juntti SA, Tollkuhn J, Wu MV, Fraser EJ, Soderborg T, Tan S, Honda S, Harada N, Shah NM (2010). The androgen receptor governs the execution, but not programming, of male sexual and territorial behaviors. *Neuron*, 66: 260-272.
- Kadioglu P, Oral G, Sayitoglu M, Erensoy N, Senel B, Gazioglu N, Sav A, Cetin G, Ozbek U (2008). Aromatase cytochrome P450 enzyme expression in human pituitary. *Pituitary*, 11: 29-35.
- Kagayama M (1965). The follicular cell in the pars distalis of the dog pituitary gland: an electron microscopic study. *Endocrinology*, 77: 1053-1060.
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW (1997). Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology*, 138: 1224-1231.
- Kaiser UB (2011). Gonadotropin Hormones. In: *The pituitary* (Melmed S, ed.). Academic Press, Londres, pp 205-260.
- Kalra SP (1993). Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev*, 14: 507-538.
- Kaltsas GA, Grossman AB (1998). Malignant pituitary tumours. *Pituitary*, 1: 69-81
- Kamat A, Hinshelwood MM, Murry BA, Mendelson CR (2002). Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends Endocrinol Metab*, 13: 122-128.
- Karamitopoulou E, Perentes E, Melachrinou M, Maraziotis T (1993). Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in human central nervous system neoplasms. *Acta Neuropathol*, 85: 316-322.
- Kauppi A, Chatelain P, Kirkinen P, Kivinen S, Ruokonen A (1987). Isolated prolactin deficiency in a woman with puerperal galactogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 64: 309-312.
- Kawamoto K, Kozumi T, Atita K, Takechi A, Kawamoto H (1995a). Secretion of growth-hormone (GH)-releasing hormone by GH-producing pituitary adenomas assessed by cell immunoblot analysis. *Endocrine J*, 42: 89-93.
- Kazeto Y, Trant JM (2005). Molecular biology of channel catfish brain cytochrome P450 aromatase (CYP19A2): cloning, preovulatory induction of gene expression, hormonal gene regulation and analysis of promoter region. *J Mol Endocrinol*, 35: 571-583.
- Khalil MW, Chung N, Morley P, Glasier MA, Armstrong DT (1988). Formation and metabolism of 5(10)-estrone-3 beta,17 beta-diol, a novel 19-norandrogen produced by porcine granulosa cells from C19 aromatizable androgens. *Biochem Biophys Res Commun*, 155: 144-150.
- Knigge KM (1955). Identity of the argyrophilic cells in the pars distalis of the rats pituitary gland. *Endocrinology*, 51: 717-729.

- Kim DS, Yoon JH, Ahn SK, Kim KE, Seong RH, Hong SH (1995). A 33kDa Pit-1-like protein binds to the distal region of the human thyrotrophin alpha-subunit gene. *J Mol Endocrinol*, 14: 313-322.
- Koritke JG, Duverloy H (1960). Les connexions vasculaires du systeme porte hypophysaire. *Anat Anz*, 108: 786-806.
- Kottler ML, Chauvin S, Lahlou N, Harris CE, Johnston CJ, Lagarde JP, Bouchard P, Farid NR, Counis R (2000). A new compound heterozygous mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor (L314X, Q106R) in a woman with complete hypogonadotropic hypogonadism: chronic estrogen administration amplifies the gonadotropin defect. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 3002-3008.
- Kovacs K, Stefaneanu L, Horvath E, Lloyd RV, Lancranjan I, Buchfelder M, Fahlbusch R (1991). Effect of dopamine agonist medication on prolactin producing pituitary adenomas. A morphological study including immunocytochemistry, electron microscopy and in situ hybridization. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 418: 439-446.
- Kovacs K, Horvath E (2005). Effects of medical therapy on pituitary tumors. *Ultrastruct Pathol*, 29: 163-167.
- Kovacs K, Rotondo F, Stefanuanu L, Fereidooni F, Horvarth E, Lloyd RV (2001). Glucocorticoid receptor expression in nontumorous human pituitaries and pituitary adenomas. *Endocr Pathol*, 11: 267-275.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS*, 93: 5925-5930.
- Kurosumi K (1968). Functional classification of cell types of the anterior pituitary gland accomplished by electron microscopy. *Arch Histol Jap*, 29: 329-362.
- Kurosumi K (1984). Mechanism of secretion in endocrine glands. En: *Ultrastructure of Endocrine Cells and Tissues*. Motta PM, editor. Martinus Nijhoff Publishers, pp 1-11.
- Kwa HG, Van der Gugten AA, Verhofstad F (1969). Radioimmunoassay of rat prolactin. Comparison of rat prolactin preparations isolated from the granular fraction of pituitary tumor transplants and from normal pituitary glands. *Eur J Cancer*, 5: 559-569.
- Kwakowsky A, Koszegi Z, Cheong RY, Abrahám IM (2013). Neuroprotective effects of non-classical estrogen-like signaling activators: from mechanism to potential implications. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 12: 1219-1225.
- Kwakowsky A, Cheong RY, Herbison AE, Abraham IM (2014). Non-classical effects of estradiol on cAMP responsive element binding protein phosphorylation in gonadotropin-releasing hormone neurons: Mechanisms and role. *Frontiers Neuroendocrinol*, 35: 31-41.
- Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B (1997). Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 2396-2402.
- Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Rivest S (1998). Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol*, 36: 357-378.
- LaMarca HL, Rosen JM (2008). Minireview: Hormones and mammary cell fate what will I become when I grow up? *Endocrinology*, 149: 4317-4321.
- Landberg G, Gross G (1991). Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res*, 51: 4570-4574.

- Lanzino M, Catalano S, Genissel C, Ando S, Carreau S, Hamra K, McPhaul MJ (2001). Aromatase messenger RNA is derived from the proximal promoter of the aromatase gene in Leydig, Sertoli, and germ cells of the rat testis. *Biol Reprod*, 64: 1439-1443.
- LaPensee CR, Horseman ND, Tso P, Brandebourg TD, Hugo ER, Ben-Jonathan N (2006). The prolactin-deficient mouse has an unaltered metabolic phenotype. *Endocrinology*, 147: 4638-4645.
- Lappano R, De Marco P, De Francesco EM, Chimento A, Pezzi V, Maggiolini M (2013). Cross talk between GPER and growth factor signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 137: 50-56.
- Larrínaga JM (2011). Expresión de la aromatasa P450 en los prolactinomas y su relación con la proliferación celular y apoptosis. Tesis Doctoral en Medicina. Universidad de Salamanca.
- Larsson LI, Fahrenkrug J, Schaffalitzky DE, Muckadeli OB, Sundler F, Hanson R, Rehfeld JF (1976). Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73: 3197-3200.
- Le Dafniet M, Blumberg-Tick J, Gozlan H, Barret A, Joubert D, Peillon F (1989). Altered balance between thyrotropin-releasing hormone (TRH) and dopamine (DA) in prolactinomas and other tumors compared to normal pituitaries. *J Clin Endocrinol Metab*, 69: 267-271.
- Le Dafniet M, Grouselle D, Li JY (1987). Evidence of TRH and TRH binding sites in human nonsecreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 65: 1014-1019.
- Le Dafniet M, Lefebvre P, Barret A, Mechain C, Feinstein MC, Brandi AM, Peillon F (1990). Normal and adenomatous human pituitaries secrete thyrotropin releasing hormone in vitro: modulation by dopamine, haloperidol and somatostatin. *J Clin Endocrinol Metab*, 71: 480-486.
- Leadem ChA, Blask DE (1982). Immunocytochemical and ultrastructural correlates of the pineal inhibition of prolactin cell activity in blind anosmic female rats. *Cell Tissue Res*, 227: 343-350.
- Leatherman JF, Percy R (1976). Structure of the non granulated cells in the hypophyseal rostral pars distalis of cyclostomes and actinopterygians. *Cell Tissue Res*, 166: 185-200.
- Lee P (1988). Pubertal neuroendocrine maturation: Early differentiation and stages of development. *Adolesc Pediatr Gynecol*, 1: 3-14.
- Lee YS, Dutta A (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*, 21: 1025-1030.
- Lephart ED, Ojeda SR (1990). Hypothalamic aromatase activity in male and female rats during juvenile peripubertal development. *Neuroendocrinology*, 51: 385-393.
- Levy A, Lightman SL (1992). Relationship between somatostatin and growth hormone messenger ribonucleic acid in human pituitary adenomas: an in situ hybridization histochemistry study. *Clin Endocrinol*, 32: 661-668.
- Levy A, Lightman S (2003). Molecular defects in the pathogenesis of pituitary tumours. *Front Neuroendocrinol*, 24: 94-127.
- Li JY, Knapp RJ, Stemberger LA (1984). Immunocytochemistry of a private luteinizing-hormone-releasing hormone system in the pituitary. *Cell Tissue Res*, 253: 263-266.

- Liew SH, Drummond AE, Jones ME, Findlay JK (2010). The lack of estrogen and excess luteinizing hormone are responsible for the female ArKO mouse phenotype. *Mol Cell Endocrinol*, 327: 56-64.
- Lindzey J, Wetsel WC, Couse JF, Stoker T, Cooper R, Korach KS (1998). Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor-knockout mice. *Endocrinology*, 139: 4092-4101.
- Little DV (1974). A third note on recent research in geometrical probability. *Advanc Appl Prob*, 6: 103.
- Lloyd RV, Kovacs K, Young Jr. WF, Farrel WE, Asa SL, Truillas J, Kontogeorgos G, Sano T, Scheithauer BW, Horvath E, DeLellis RA, Heitz PU (2004). Pituitary tumors. En: DeLellis R, Lloyd RV, Heitz PV, Eng C, eds. *Introduction. WHO classification of tumors of the endocrine organs: pathology and genetics of endocrine organs*. Lyon, ARC Press, 10-13.
- Losa M, Schopohl J, Müller OA, von Werder K (1985). Growth hormone releasing factor induces prolactin secretion in acromegalic patients but not in normal subjects. *Acta Endocrinol*, 109: 467-473.
- Loud AV, Barany WC, Pack BA (1965). Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs. *Lab Invest*, 14: 996-1008.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 11162-11166.
- Luciano AA, Sherman BM, Chapler FK, Hauser KS, Wallace RB (1985). Hyperprolactinemia and contraception: a prospective study. *Obstet Gynecol*, 65: 506-511.
- Magoffin DA (2005). Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 1344-1349.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83: 835-839.
- Martini L (1982). The 5 α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures: Biochemical and physiological implications. *Endocr Rev*, 3: 1-25.
- Marynick SP, Loriaux DL, Sherins RJ, Pita JC, Lipsett MB (1979). Evidence that testosterone can suppress pituitary gonadotropin secretion independently of peripheral aromatization. *J Clin Endocrinol Metab*, 49: 396-398.
- May V, Wilber JF, U'Prichard DC, ~ds GV (1987). Persistence of immunoreactive TRH and GnRH in long-term primary anterior pituitary cultures. *Peptides*, 8: 543-558.
- Mayhew TM, Cruz LM (1973). Stereological correction procedures for estimating true volume proportions from biased samples. *J Microscopy*, 99: 287-299.
- McCarty MM (1994). Molecular aspects of sexual differentiation of the rodent brain. *Psychoneuroendocrinology*, 19: 415-427.
- McCullagh DR (1932). Dual endocrine activity of the testes. *Science*, 76: 19-20.
- McDevitt MA, Glidewell-Kenney C, Jimenez MA, Ahearn PC, Weiss J, Jameson JL (2008). New insights into the classical and non-classical actions of estrogen: Evidence from estrogen receptor knock-out and knock-in mice. *Mol Cell Endocrinol*, 290: 24-30.
- McManus JFA (1946). Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 1258: 202-205.

- Melmed S (2003). Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*, 112: 1603-1618.
- Menuet A, Anglade I, Le Guevel R, Pellegrini E, Pakdel F, Kah O (2003). Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. *J Comp Neurol*, 462: 180-193.
- Mesguchi P, Benoit R, Dubois PM, Morel G (1988). Somatostatin-28 and somatostatin 14-like immunoreactivities in the rat pituitary gland. *Cell Tissue Res*, 252: 419-427.
- Micevych P, Sinchak K (2008). Synthesis and function of hypothalamic neuroprogesterone in reproduction. *Endocrinology*, 149: 2739-2742.
- Miles RE (1972). Multi-dimensional perspectives on stereology. *J Microscopy*, 95: 181.
- Miller GM, Alexander JM, Klibanski A (1996). Gonadotropin-releasing hormone messenger RNA expression in gonadotroph tumors and normal human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 80-83.
- Miller WL, Strauss JF (1999). Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69: 131-141.
- Mitwally MF, Casper RF (2001). Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. *Fertil Steril*, 75: 305-309.
- Miyaura C, Toda K, Inada M, Ohshiba T, Matsumoto C, Okada T, Ito M, Shizuta Y, Ito A (2001). Sex- and age-related response to aromatase deficiency in bone. *Biochem Biophys Res Commun*, 280: 1062-1068.
- Montero M, Sánchez F, Juanes JA, Blanco E, González R, Vázquez R, Carretero J (1990). Morphometric study of the ACTH-immunoreactive adenohypophyseal cells. *An Anat*, 36: 47-54.
- Morel G, Besson J, Rosselin G, Dubois PM (1982). Ultrastructural evidence for endogenous vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the pituitary gland. *Neuroendocrinology*, 34: 85-89.
- Morel G, Mesguich P, Dubois MP, Dubois PM (1983). Ultrastructural evidence for endogenous somatostatin-like immunoreactivity in the pituitary gland. *Neuroendocrinology*, 36: 291-299.
- Morgan PJ, Williams LM (1996). The pars tuberalis of the pituitary: A gateway for neuroendocrine output. *Rev Reprod*, 1: 153-161.
- Moriarty GC (1973). Adenohypophysis ultrastructural cytochemistry. A review. *J Histochem Cytochem*, 21: 855-894.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996). ER β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*, 392: 49-53.
- Mountcastle RB, Roof BS, Mayfield RK, Mordes DB, Sagel J, Biggs PI, Rawe SE (1989). Pituitary adenocarcinoma in an acromegalic patient: response to bromocriptine and pituitary testing: a review of the literature on 36 cases of pituitary carcinoma. *Am J Med Sci*, 298: 109-118.
- Murakami T, Ohtsuka A, Taguchi T, Kikuta A, Ohtajrio O (1985). Blood vascular bed of the rat pituitary intermediate lobe, with special reference to its development and portal drainage into the anterior lobe. A scanning electron microscope study of vascular nets. *Arch hist Jap*, 48: 69-87.
- Naftolin F, Garcia-Segura LM, Keefe D, Leranth C, Maclusky NJ, Brawer JR (1990). Estrogen effects on the synaptology and neural membranes of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Biol Reprod*, 42: 21-28.

- Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K (1980). S-100 acidic protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res*, 91: 523-531.
- Nakane PK (1970). Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem*, 18: 9-20.
- Nakane PK (1975). Identification of anterior pituitary cells by immunoelectron microscopy. En: Tixier-Vidal A, Farquhar MG (eds). *The anterior pituitary*. Academic Press Inc., New York-San Francisco, pp 46-61.
- Nakane PK (1988). Identification of anterior pituitary cells by immunoelectron microscopy. *Wirschows Archiv A Pathol Anat*, 413: 61-68.
- Nakane PK, Moriuchi T, Koji T, Taniguchi Y, Izumi S, Hui L (1989). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin): review and some new findings. *Acta Histochem Cytochem*, 22: 105-116.
- Neill J (1972). Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrinology*, 90: 1154-1159.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O (1993). The P450 superfamily: up-date on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*, 12: 1-51.
- Nephew KP, Sheeler CQ, Dudley MD, Gordon S, Nayfield SG, Khan SA (1998). Studies of dehydroepiandrosterone (DHEA) with the human estrogen receptor in yeast. *Mol Cell Endocrinol*, 143: 133-142.
- Neville MC, McFadden TB, Forsyth I (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7: 49-66.
- Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J (2005). Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res*, 64: 157-165.
- Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF, Osawa Y, Shizuta Y, Toda K, Bahr JM (1993). Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*, 132: 1396-1401.
- Nocillado JN, Elizur A, Avitan A, Carrick F, Levasi-Sivan B (2007). Cytochrome P450 aromatase in grey mullet: cDNA and promoter isolation; brain, pituitary and ovarian expression during puberty. *Mol Cell Endocrinol*, 263: 65-78.
- Noel GL, Dimond RC, Wartofsky L, Earll JM, Frantz AG (1974). Studies of prolactin and TSH secretion by continuous infusion of small amounts of thyrotropin-releasing hormone (TRH). *J Clin Endocrinol Metab*, 39: 6-17.
- Nose-Alberti V, Mesquita MI, Martin LC, Kayath MJ (1998). Adrenocorticotropin-producing pituitary carcinoma with expression of c-erbB-2 and high PCNA index: a comparative study with pituitary adenomas and normal pituitary tissues. *Endocr Pathol*, 9: 53-62.
- Odell WD, Utiger RD, Wilber JF, Condliffe PG (1967). Estimation of the secretion rate of thyrotropin in man. *J Clin Invest*, 46: 953-959.
- Odell WD, Parlow AF, Cargille CM, Ross GT (1968). Radioimmunoassay for human follicle-stimulating hormone: Physiological studies. *J Clin Invest*, 47: 2551-2562.
- Odell WD, Swerdloff RS (1968). Progestogen-induced luteinizing and follicle-stimulating hormone surge in postmenopausal women: A simulated ovulatory peak. *Proc Nat Acad Sci USA*, 61: 529-536.
- Oz OK, Zerwekh JE, Fisher C, Graves K, Nanu L, Millsaps R, Simpson ER (2000). Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency. *J Bone Miner Res*, 15: 507-514.

- Page RB, Munger BL, Berglaid RMM (1976). In the rabbit, mouse, rat and dog a vascular cleft separates the reticular neurohypophysial capillary bed within the infundibular stem and process from the adjacent, linear, adenohypophyseal capillary bed. Short portal vessels bridge this cleft. *Am J Anat*, 146: 273-302.
- Pagesy P, Li JY, Berthet M, Peillon F (1992). Evidence of gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat anterior pituitary. *Mol Endocrinol*, 6: 523-528.
- Pearse AGE, Van Hoordeb S (1963). Functional cytology of the human adenohypophysis. *Can Med Ass J*, 88: 462-471.
- Peillon F, Le Dafniet M, Garnier Ph, Brandi AM, Moyse E, Birman P, Blumberg-Tick J, Grouselle D, Joubert D (1989). Receptors and neurohormones studies in human pituitary adenomas. *Hormone Res*, 31: 13-18.
- Peillon F, Le Dafniet M, Pagesy P, Li JY, Benlot C, Lagoguey A, Brandi AM, Joubert D (1990). Neuropeptides d'origine antéhypophysaire. *Ann Endocrinol (Paris)*, 51: 133-136.
- Peillon F, Le Dafniet M, Pagesy P, Li JY, Benlot C, Brandi AM, Joubert D (1991). Neuropeptides of anterior pituitary origin. Autocrine or paracrine functions? *Path Res Pract*, 187: 577-580.
- Peillon F, Le Dafniet M, Pagesy P, Croissdeau G, Schussler N, Joubert D, Li JY (1997). Régulation paracrine des hormones antéhypophysaires par les neuropeptides. *Ann Endocrinol (Paris)*, 58: 31-38.
- Pernicone PI, Scheithauer BW, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvarth E, Young Jr. WF, Lloyd RV, Davis DH, Guthrie BL, Schoene WC (1997). Pituitary carcinoma: a clinicopathologic study of 15 cases. *Cancer*, 79: 804-812.
- Perryman EK (1975). Ultrastructure of the stellate cell in the pars intermedia of the frog, *Rana pipiens*. *Cell Tissue Res*, 164: 387-399.
- Perryman EK, De Vellis J, Bagnara JT (1980). Phagocytic activity of the stellate cells in the anuran pars intermedia. *Cell Tissue Res*, 208: 85-98.
- Petersen SL, Ottem EN, Carpenter CD (2003). Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod*, 69: 1771-1778.
- Petrusz P, Sar M, Ordonneau P, Dimeo P (1976). Specificity in immunocytochemical staining. *J Histochem Cytochem*, 24: 1110-1115.
- Phifer RP, Midgley AR, Spicer SS (1973). Immunohistologic and histologic evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone are present in the same cell type in the human pars distalis. *J Clin Endocrinol Metab*, 36: 125-141.
- Plant TM (1986). Gonadal regulation of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in primates. *Endocr Rev*, 7: 75-88.
- Plourde PV, Dyroff M, Dukes M (1994). Arimidex: A potent and selective fourth-generation aromatase inhibitor. *Breast Cancer Res Treatment*, 30: 103-111.
- Poole MC, Mahesh VB, Costoff A (1980). Intracellular dynamics in pituitary mammatropes throughout the rat. I. Morphometric methodology and hormonal correlation with cellular and nuclear volumes. *Am J Anat*, 158: 3-13.
- Porter JC, Icai RS, Kaxbhri IA, Grazia YR (1970). A procedure for the cannulation of a pituitary stalk portal vessel and perfusion of the pars distalis in the rat. *Endocrinology*, 87: 197201.
- Porter JC, Oido JC, Cramer OM (1974). Nervous and vascular supply of the pituitary gland. En: *Handbook of Physiology*, Vol. IV (Knobil E, Sawyer M, eds.) Section 7. Greep D, Eastwood EB, eds. Am Physiol Soc, Washington DC, pp 33-34.

- Prezant TR, Melmed S (2002). Molecular pathogenesis of pituitary disorders. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes*, 9: 61-78.
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ (2008). Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annual Rev Physiol*, 70: 165-190.
- Prossnitz ER, Maggiolini M (2009). Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol*, 308: 32-38.
- Purves HD, Griesbach WE (1951). The site of thyrotrophin and gonadotrophin production in the rat pituitary studied by McManus hotchkiss staining for glycoprotein. *Endocrinology*, 49: 244-264.
- Purves HD, Griesbach YE (1954). The site of follicle stimulating and luteinizing hormone production in the rat pituitary. *Endocrinology*, 55: 785-793.
- Purves HD, Griesbach YE (1956). Changes in basophil cells of rat pituitary after thyroidectomy. *J Endocrinol*, 13: 365-375.
- Puy LA, Ciocca DR (1986). Human pharyngeal and sellar pituitary glands: Differences and similarities revealed by an immunocytochemical study. *J Endocrinol*, 108: 231-238.
- Romeis B (1940). Die Hypophyse. En: *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen* (Von Mollendorff W, ed.). Springer, Berlin, 6: 389-474.
- Ragel BT, Couldwell WT (2004). Pituitary carcinoma: a review of the literature. *Neurosurg Focus*, 16: E7.
- Ramirez VD, McCann SM (1965). Inhibitory effect of testosterone on luteinizing hormone secretion in immature and adult rats. *Endocrinology*, 76: 412-417.
- Rawdon BB (1978). Ultrastructure of the nongranulated hypophyseal cells in the teleost *Pseudocrenilabrus philander* (*Hemohaplochromis phileander*) with particular reference to cytological changes in culture. *Acta Zool (Stockh)*, 59: 25-33.
- Raymond V, Beaulieu M, Labrie F, Boissier J (1978). Potent anti-dopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science*, 200: 1173-1175.
- Richards JS (1980). Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev*, 60: 51-89.
- Richards JS, Pangas SA (2010). The ovary: Basic biology and clinical implications. *J Clin Invest*, 120: 963-972.
- Rigg LA, Lein A, Yen SS (1977). Pattern of increase in circulating prolactin levels during human gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 129: 454-456.
- Rinehart JF, Farquhar MG (1953). Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland. *J Histochem Cytochem*, 1: 93-113.
- Robertson KM, Simpson ER, Lacham-Kaplan O, Jones ME (2001). Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. *J Androl*, 22: 825-830.
- Robker RL, Richards JS (1998). Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol*, 12: 924-940.
- Rohr HP, Bartsch G, Oberholzer M, Reith A, Hollinger O (1978). Stereology. En: *Electron microscopy in human medicine. I. Instrumentation and techniques*. Johannessen JV, ed. McGraw-Hill International Book Company, London, pp 285-309.
- Roncaroli F, Scheithauer BW, Young WF, Horvath E, Kovacs K, Kros JM, Al Sarraj S, Lloyd RV, Faustini-Fustini M (2003). Silent corticotroph carcinoma of the adenohypophysis: a report of five cases. *Am J Surg Pathol*, 27: 477-486.

- Roseweir AK, Millar RP (2009). The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum Reprod Update*, 15: 203-212.
- Rubio M, Carretero J, Sánchez F, Riesco JM, Vázquez RJ, Vázquez R (1992). Estradiol influences the LH response to met-enkephalin. *Acta Anat*, 145: 382-386.
- Rubio M, Sánchez F, Carretero J, Riesco JM, Cabo L, Vázquez R (1994). Immunohistochemical-morphometric study of the LH-adenohypophyseal cells following chronic treatment with met-enkephalin. *Histol Histopathol*, 9: 221-226.
- Rudman D, Kutner MH, Rogers CM, Lubin MF, Fleming GA, Bain RP (1981). Impaired growth hormone secretion in the adult population: Relation to age and adiposity. *J Clin Invest*, 67: 1361-1369.
- Russell-Aulet M, Jaffe CA, Demott-Friberg R, Barkan AL (1999). In vivo semiquantification of hypothalamic growth hormone-releasing hormone (GHRH) output in humans: Evidence for relative GHRH deficiency in aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 3490-3497.
- Sadoul JL, Thyss A, Freychet P. 1992. Invasive mixed growth hormone/prolactin secreting pituitary tumour: complete shrinking by octreotide and bromocriptine, and lack of tumour growth relapse 20 months after octreotide withdrawal. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. 126: 179-183.
- Said SI, Mutt V (1970). Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, 169: 1217-1218.
- Said SI, Rosemberg RN (1976). Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. *Science*, 192: 907-908.
- Said SI, Porter JC (1979). Vasoactive intestinal polypeptide: release into hypophyseal portal blood. *Life Sci*, 24: 227-230.
- Samson WK, Said SI, McCann SM (1979). Radioimmunologic localization of vasoactive intestinal polypeptide in hypothalamic and extrahypothalamic sites in the rat brain. *Neurosci Lett*, 12: 265.
- Sánchez F, Carretero J, Rubio M, Riesco JM, Vázquez R (1993). Morphometric analysis of the hypoactivity of FSH-immunoreactive cells in estrogen-primed male rats. *Acta Histochem*, 94: 125-130.
- Santalo LA (1936). *Geometría integral* 15. *Abhandlungen* 12.
- Santen RJ, Samojlik E, Wells SA (1980). Resistance of the ovary to blockade of aromatization with aminoglutethimide. *J Clin Endocrinol Metab*, 51: 473-477.
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J (1983). Relation of the neuroendocrine system to development of prolactin secretion pituitary tumors. En: Meites J, ed. *Neuroendocrinology of Aging*. New York, Plenum Press, pp 353-376.
- Sarkar DK (2006). Genesis of prolactinomas: studies using estrogen-treated animals. *Front Horm Res*, 35: 32-49.
- Sasaki F, Sano M (1980). Role of the ovary in the sexual differentiation of prolactin and growth hormone cells in the mouse adenohypophysis during postnatal development: a stereological morphometry study by electron microscopy. *J Endocrinol*, 85: 283-289.
- Sasaki F, Sano M (1982). Role of the ovary in the sexual differentiation of prolactin and growth hormone cells in the mouse adenohypophysis: a stereological morphometric study by electron microscopy. *J Endocrinol*, 93: 117-121.
- Sasano H, Frost AR, Saitoh R, Harada N, Poutanen M, Vihko R, Bulun SE, Silverberg SG, Nagura H (1996). Aromatase and 17-hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 in human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 4042-4046.

- Saunders PTK, Millar MR, Williams K, Macpherson S, Harkiss D, Anderson RA, Orr B, Nigel P, Groome GS, Fraser HM (2000). Differential expression of estrogen receptor- α and - β and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans. *Biol Reprod*, 63: 1098-1105.
- Saunders SL, Reifel CW, Shin SH (1983). Ultrastructural changes rapidly induced by somatostatin may inhibit prolactin release in estrogen-primed rat adenohypophysis. *Cell Tissue Res*, 232: 21-34.
- Schechter J (1969). The ultrastructure of the stellate cell in the rabbit pars distalis. *Am J Anat*, 126: 477-488.
- Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd RV, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, Yapici O, Young WF Jr, Meyer FB, Kuroki T, Riehle DL, Laws ER Jr (2006). Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. *Neurosurgery*, 59: 341-353.
- Schonemann A (1892). Hypophysis und Thyroides. *Virchow Arch*, 216: 443-452.
- Schultz HJ, Pratzner RA, Adam M (1979). Fine structure of the agranular adenohypophysis cells in the dogfish *muxynes glutiosa* (cyctostome). *Cell Tissue Res*, 204: 67-76.
- Schwartz BR, Pinkus G, Bacus S, Toder M, Weinberg DS (1989). Cell proliferation in non-Hodgkin's lymphoms. Digital image analysis of KI67 antibody staining. *Am J Pathol*, 134: 327-336.
- Sebastian S, Bulun SE (2001). A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 4600-4602.
- Segerson TP, Lam KSL, Cacicedo L, Minamitani N, Fink JS, Lechan RM, Reichlin S (1989). Thyroid hormone regulates vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA levels in the rat anterior pituitary gland. *Endocrinology*, 125: 2221-2223.
- Sernia C, Shinkel TA, Thomas WG, Ho KKY, Lincoln D (1992). Angiotensinogen secretion by single rat pituitary cells: detection by a reverse haemolytic plaque assay and cell identification by immunocytochemistry. *Neuroendocrinology*, 55: 308-316.
- Seminara SB, Hayes FJ, Crowley WF (1998). Gonadotropinreleasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): Pathophysiological and genetic considerations. *Endocr Rev*, 19: 521-539.
- Senovilla L, Núñez L, de Campos JM, de Luis DA, Romero E, Sánchez A, García-Sancho J, Villalobos C (2004). Multifunctional cells in human pituitary adenomas: implications for paradoxical secretion and tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 4545-4552.
- Severinghaus AE (1937). Cellular changes in the anterior hypophysis with special reference to its secretory activity. *Physiol Rev*, 17: 556-588.
- Shaver SW, Pang JJ, Wainman DS, Wall KM, Gross PM (1992). Morphology and function of capillary networks in subregions of the rat tuber cinereum. *Cell Tissue Res*, 267: 437-448.
- Sheperd NA, Richman PI, England J (1988). KI 67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol*, 155: 1213-1219.
- Shirasawa N, Kihara H, Yamaguchi S, Yoshimura F (1983). Pituitary folliculostellated cells immunostained with S-100 acidic protein antiserum in postnatal, castrated and thyroidectomized rats. *Cell Tissue Res*, 231: 235-249.
- Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature*, 304: 345-347.

- Shughrue P, Scrimo P, Lane M, Askew R, Merchenthaler I (1997). The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology*, 138: 5649-5652.
- Shy KK, McTiernan AM, Daling JR, Weiss NS (1983). Oral contraceptives use and the occurrence of pituitary prolactinoma. *J Am Med Assoc*, 249: 2204-2207.
- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, 294: 76-95.
- Simpson ER (2000). Role of aromatase in sex steroid action. *J Mol Endocrinol*, 25: 149-156.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Bendelson CR, Bulun SE (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*, 15: 342-355.
- Sinha YN (1995). Structural variants of prolactin: Occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, 16: 354-369.
- Siperstein E, Nichols CW Jr, Griesbach WE, Chalkoef IL (1954). Cytological changes in the rat anterior pituitary from birth to maturity. *Anat Rec*, 118: 593-620.
- Skelser GK (1944). Differential centrifugation of hormones in the central and peripheral zones of the bovine anterior pituitary gland. *Endocrinology*, 34: 39-43.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146: 3686-3692.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146: 3686-3692.
- Solcia E, Usellini L, Buffa R, Rindi G, Villani L, Zampatti C, Silini E (1987). Endocrine cells producing regulatory peptides. *Experientia*, 43: 839-850.
- Sorby H (1856). On slaty cleavage as exhibited in the Devonian limestones of Devonshire. *Phil Mag*, 11: 20.
- Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet-of-Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature*, 384: 327-333.
- Soules MR, Steiner RA, Clifton DK, Cohen NL, Aksel S, Bremner WJ (1984). Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 58: 378-383.
- Stell JH, O'Halloran DJ, Emson MA, Van Noorden S, Bloom SR, Polak JM (1992). Identification of bombesin-immunoreactive cells in rat, human and other mammalian pituitaries, their ontogeny and the effect of endocrine manipulations in the rat. *Endocrinology*, 130: 2587-2596.
- Stein RC, Dowsett M, Hedley A, Davenport J, Gazet JC, Ford HT (1990). Treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women with 4-hydroxyandrostenedione. *Cancer Chemother Pharmacol*, 26: 75-78.
- Sternberger L (1979). *Immunocytochemistry*. Wiley J Sons, New York, 2^a ed.
- Surks MI, De Fesi CR (1977). Determination of the cell number of each cell type in the anterior pituitary of euthyroid and hypothyroid rats. *Endocrinology*, 101: 946-958.

- Svalander Ch (1974). Ultrastructure of the fetal rat adenohypophysis. *Acta Endocrinol*, 76 (Supl 188): 11-13.
- Szymanski L, Bakker J (2012). Aromatase knockout mice show normal steroid-induced activation of gonadotrophin releasing hormone neurones and luteinising hormone surges with a reduced population of kisspeptin neurones in the rostral hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, 24: 1222-1233.
- Takahashi S, Kawashima S (1982). Age-related changes in prolactin cell percentage and serum prolactin levels in intact and neonatally gonadectomized male and female rats. *Acta Anat*, 113: 211-217.
- Taylor WA, Uttley D, Wilkins PR (1994). Multiple dural metastases from a pituitary adenoma. Case report. *J Neurosurg*, 81: 624-626.
- Temple JL, Laing E, Sunder A, Wray S (2004). Direct action of estradiol on gonadotropin-releasing hormone- neuronal activity via a transcription-dependent mechanism. *J Neurosci*, 24: 6326-6333.
- Thompson EA, Siiteri PK (1974a). The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. *J Biol Chem*, 249: 5373-5378.
- Thompson EA, Siiteri PK (1974b). Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adeninedinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J Biol Chem*, 249: 5364-5372.
- Timson CM, Polak JM, Wharton J, Ghatei MA, Bloom SR, Usellini L, Capella C, Solcia E, Brown MR, Pearse AGE (1979). Bombesin-like immunoreactivity in the avian gut and its localization to a distinct cell type. *Histochemistry*, 61: 213-221.
- Toda K, Shizuta Y (1993). Molecular cloning of a cDNA showing alternative splicing of the 5'-untranslated sequence of mRNA for human aromatase P-450. *Eur J Biochem*, 213: 383-389.
- Tougard C, Picart R, Tixier-Vidal A, Jutisz M (1971). Localization par cyto-immunoenzymologie de la LH de ses sous-unite α et β , et de la FSH dans l'adenohypophyse de la rat castrée. *Acad Sci*, 273: 897-900.
- Tougard C, Kerdelhue B, Tixier-Vidal A, Jutisz M (1973). Light and electron microscope localization of binding sites of antibodies against ovine luteinizing hormone and its two subunits in rat adenohypophysis using peroxidase-labeled antibody technique. *J Cell Biol*, 58: 503-521.
- Tougard C, Picart R, Tixier-Vidal A (1980). Immunocytochemical localization of glycoprotein hormones in the rat anterior pituitary. A light and electron microscope study using antisera against rat β subunit: A comparison between preembedding and postembedding methods. *J Histochem Cytochem*, 28: 101-114.
- Trubiroha A, Kroupova H, Wuertz S, Kloas W (2012). Up-regulation of gonadotropin mRNA-expression at the onset of gametogenesis in the roach (*Rutilus rutilus*): evidence for an important role of brain-type aromatase (cyp19a1b) in the pituitary. *Gen Comp Endocrinol*, 178: 529-538.
- Trunet PF, Mueller P, Bhatnagar AS, Dickes I, Monnet G, White G (1993). Open dose-finding study of a new potent and selective nonsteroidal aromatase inhibitor, CGS 20 267, in healthy male subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 77: 319-323.
- Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA (2003). Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev*, 24: 600-632.
- Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R (1987). Isolation and partial characterization of follistatin: A single chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Nat Acad Sci USA*, 84: 8282-8286.

- Underwood EE (1970). Quantitative sterology. Addison Wesley, Massachusetts.
- Urman S, Critchlow V (1983). Long-term elevations in plasma thyrotropin, but not growth hormone, concentrations associated with lesion-induced depletion of median eminence somatostatin. *Endocrinology*, 112: 659-664.
- Van Cauter E, Leproult R, Plat L (2000). Age-related changes in slow wave sleep and REM sleep and relationship with growth hormone and cortisol levels in healthy men. *JAMA*, 284: 861-868.
- Van Oordt PGYJ (1965). Nomenclature of the hormone producing cells in the adenohypophysis. *Gen Comp Endocr*, 5: 131-134.
- Vance ML (2003). Medical treatment of functional pituitary tumors. *Ultrastruct Pathol*, 14: 81-87.
- Vankelecom A, Carmeliet P, Van Damme J, Billiau A, Deneef C (1989). Production of interleukin 6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology*, 49: 102-106.
- Vázquez R, Vázquez G, Rubio M, Sánchez F, Vázquez RJ, Riesco JM, Juanes JA, Blanco E, Carretero J (1999). Effects of gonadal steroids on immunohistochemical expression of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Eur J Anat*, 3 (s1): 34.
- Vila-Porcile E (1972). Le réseau des cellules folliculo-stellaires et les follicules de l'adenohypophyse du rat (Pars Distalis). *Z Zellforsch*, 129: 328-369.
- Vila-Porcile E (1973). La pars distalis de l'hypophyse chez le rat. Contribution à son étude histologique et cytologique en microscopie électronique. *Ann Sc Nat (Zool)*, 15: 61-138.
- Villalobos C, Núñez L, García-Sancho J (2004). Phenotypic characterization of multifunctional somatotropes, mamatotropes and gonadotropes of the mouse anterior pituitary. *Pflugers Arch*, 449: 257-269.
- Vreeburg JTM, Van der Vaart PDM, Van der Schoot P (1974). Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibition neonatally of oestrogen biosynthesis. *J Endocrinol*, 74: 375-382.
- Wakabayashi I, Inokuchi K, Hasegawa OD, Sigihara H, Minami S (1992). Expression of growth hormone (GH)-releasing factor gene in GH-producing pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 74: 357-361.
- Walker AM, Farquhar MG (1980). Preferential release of newly synthesized prolactin granules is the result of functional heterogeneity among mammotrophs. *Endocrinology*, 107: 1095-1104.
- Wander HE, Blossey HC, Nagel GA (1986). Aminoglutethimide in the treatment of premenopausal patients with metastatic breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 22: 1371-1374.
- Watanabe YG (1981). Immunohistochemical study of the responsiveness of LH cells of fetal rats to synthetic LHRH in vitro. *Cell Tissue Res*, 221: 59-67.
- Watanabe YG (1985). Effects of brain and mesenchyme upon the cytogenesis of rat adenohypophysis in vitro. *Cell Tissue Res*, 242: 49-52.
- Watanabe YG (1986a). Sex differences in pituitary LH storage and release in LHRH-stimulated pubertal rats. *Cell Tissue Res*, 243: 509-515.
- Watanabe YG (1986b). A comparative in vitro study on LHRH responsiveness of LH cells of the pars tuberalis and pars distalis. *CellTissue Res*, 245: 369-375.
- Watanabe YG (1986c). Correlative study on sex differences in pituitary luteinizing hormone content and the number of immunoreactive luteinizing hormone cells in perinatal rats. *BioI Neonate*, 49: 337-343.

- Watanabe YG, Daikoku S (1979). An immunohistochemical study on the cytogenesis of adenohypophyseal cells in fetal rats. *Develop Biol*, 68: 557-567.
- Watanabe YG, Takagi Y, Kumamoto Y (1985). A correlative radioimmunoassay and immunohistochemical study of LHRH-induced LH depletion in the anterior pituitary of male and female neonatal rats in vitro. *Cell Tissue Res*, 240: 95-100.
- Weibel ER (1969). Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*, 26: 235-302.
- Weibel ER, Bolender RP (1973). Stereological techniques for electron microscopy. En: *Principle and techniques of electron microscopy*. Hyatt MA, ed. Van Nostrand-Reinhold, New York, pp: 239-296.
- Weibel ER, Kistler GS, Tondury G (1966). A stereologic electron microscope study of "tubular myelin figures" in alveolar fluids of rat lungs. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 69: 418-427.
- Wicklund JA, Wertz N, Gorski J (1981). A comparison of estrogen effect on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F-344 and Holtzman rats. *Endocrinology*, 109: 1700-1707.
- Wierman ME, Wang C (1990). Androgen selectively stimulates follicle-stimulating hormone-beta mRNA levels after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Biol Reprod*, 42: 563-571.
- Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, et al. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 109: 376-385.
- Wilson DE (1982). Pituitary carcinoma occurring as middle ear tumor. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 90: 665-666.
- Wilson DB, Christensen E (1980). Postnatal development of somatotrophs and mammotrophs in the pars distalis of the C-57 BL mouse. *Cell Tissue Res*, 211: 441-448.
- Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone H, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Perez CA, Schutz G, Herbison AE (2006). Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron*, 52: 271-280.
- Winters SJ, Janick JJ, Loriaux DL, Sherins DJ (1979). Studies on the role of sex steroids in the feedback control of gonadotropin concentrations in men. II. Use of the estrogen antagonist, clomiphene citrate. *J Clin Endocrinol Metab*, 48: 222-227.
- Wondisford FE, Radovick S, Moates JM, Usala SJ, Weintraub BD (1988). Isolation and characterization of the human thyrotropin beta-subunit gene: Differences in gene structure and promoter function from murine species. *J Biol Chem*, 263: 12538-12542.
- Wouters W, De Coster R, Krekels M, Van Dun J, Beerens D, Haelterman C (1989). R 76713, a new specific non-steroidal aromatase inhibitor. *J Steroid Biochem*, 32: 781-788.
- Yamada-Mouri N, Hirata S, Kato J (1996). Existence and expression of the untranslated first exon of aromatase mRNA in the rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 58: 163-166.
- Yamashita K (1969). Electron microscopic observations on the postnatal development of the anterior pituitary of the mouse. *Gumna Symp Endocrinol*, 6: 177-196.
- Yamashita K (1972). Fine structure of the mouse anterior pituitary maintained in a short term incubation system. *Z Zellforsch*, 124: 465-478.

- Yasin M, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Kerrigan JR, Marshall JC (1995). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse pattern regulates GnRH receptor gene expression: augmentation by estradiol. *Endocrinology*, 136: 1559-1566.
- Yoshimura F, Nogami H, Shirasawa I, Yashiro T (1981). A whole range of fine structural criteria for immunohistochemically identified LH cells in rats. *Cell Tissue Res*, 217: 1-10.
- Youngblood GL, Nesbitt MN, Payne AH (1989). The structural genes encoding P450_{scc} and P450_{arom} are closely linked on mouse chromosome 9. *Endocrinology*, 125: 2784-2786.
- Zahedi A, Booth GL, Smyth HS, Farrell WE, Clayton RN, Asa SL, Ezzat S (2001). Distinct clonal composition of primary and metastatic adrenocorticotrophic hormone-producing pituitary carcinoma. *Clin Endocrinol*, 55: 549-556.
- Zanini A, Giannattasi G, Meldolesi J (1974). Studies on in vivo synthesis and secretion of growth hormone and prolactin. II. Evidence against the existence of precursor molecules. *Endocrinology*, 94: 104-111.